

COFILIN 2 REGULIERT DIE ALCAMA-VERMITTELTE HERZMORPHOGENESE UND LINKS-RECHTS-ASYMMETRIE IM ZEBRABÄRBLING

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium

genehmigte
DISSERTATION

von
Diplom-Biologin Helene Braun
aus Leninskoje, Kasachstan

1. Referent:	Prof. Dr. Paul G. Layer
2. Referent:	Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff
Externer Referent:	Prof. Dr. Dr. Thomas Braun

Tag der Einreichung: 15.07.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2013

Darmstadt 2013

D17

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung
(W. G. Kerckhoff-Institut) in Bad Nauheim angefertigt.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	4
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	8
ZUSAMMENFASSUNG	10
SUMMARY	12
1. EINLEITUNG	14
1.1. Der Zebrafärbling als Modellorganismus	15
1.2. Die Embryonalentwicklung des Zebrafärblings	15
1.3. Kardiogenese im Zebrafärblingembryo	18
1.4. Das zweite Herzfeld	20
1.4.1. SHF im Zebrafärbling	21
1.4.2. Islet 1	22
1.4.3. Mef2c	23
1.4.4. Nkx2.5	23
1.5. Alcam	24
1.5.1. Biologische Funktionen von Alcam	25
1.5.2. Alcam im Zebrafärbling	26
1.6. Aktinzytoskelett	27
1.7. Cofilin	31
1.7.1. Die ADF/Cofilin-Familie	31
1.7.2. Biochemische Charakterisierung der ADF/Cofilin-Familie	32
1.7.3. Regulationsmechanismen der ADF/Cofilin-Aktivität	34
1.8. Die Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie	36
1.8.1. Der Bruch der Symmetrie	37
1.8.1.1. Die Initiierung der Links-Rechts-Asymmetrie in der Maus	37
1.8.1.2. Zwei Modelle zum Bruch der Symmetrie durch den <i>Nodal Flow</i>	38
1.8.1.3. Das Kupffersche Vesikel ist das Lateralitätsorgan des Zebrafärblings	39
1.8.1.4. Regulation der Entwicklung vom Kupfferschen Vesikel	41
1.8.2. Die Etablierung der asymmetrischen Genexpression	42
1.8.3. Die asymmetrische Organmorphogenese	44
1.9. Zielsetzung der Arbeit	44
2. ERGEBNISSE	46
2.1. Cofilin 2 interagiert mit Alcama und reguliert die Herz-morphogenese im Zebrafärbling	47
2.1.1. Cofilin 2 interagiert mit Alcama	47
2.1.2. Zeitlich-räumliches Expressionsmuster von <i>cofilin 2</i> im Zebrafärblingembryo	48
2.1.3. Transienter <i>Knockdown</i> von <i>cfl2</i> in Zebrafärblingembryonen	50
2.1.4. Der <i>Knockdown</i> von <i>cfl2</i> löst Defekte in der Herzmorphogenese aus	53
2.1.5. Cofilin 2 reguliert die Alcama-Lokalisation in den ventrikulären Kardiomyozyten und ihre morphologische Differenzierung	54

2.1.6. Die Cofilin 2-abhängige Kontrolle der Kardiomyozytenzahl ist Herzkammer-spezifisch	56
2.1.7. Aktin-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Kardiomyozytenzahl	57
2.1.8. Cofilin 2-Funktion wird für die <i>vmhc</i> -Expression in den SHF-Zellen benötigt	59
2.1.9. Cofilin 2 hat keinen negativen Einfluss auf die Spezifizierung der kardiovaskulären Vorläuferzellen	60
2.1.10. Cofilin 2 fördert die Differenzierung von glatten Muskelzellen am arteriellen Pol	62
2.1.11. Cofilin 2 wird für die <i>mef2cb</i> -Expression in den SHF-Zellen am arteriellen Pol benötigt	64
2.1.12. Cofilin 2 kontrolliert die <i>amhc</i> -Expression nach dem 26-Somitenstadium	65
2.1.13. Cofilin 2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation atrialer Zellen	66
2.1.14. Cofilin 2 agiert <i>upstream</i> von <i>Isl</i> und limitiert seine Expression am venösen Pol	67
2.1.15. Cofilin 2 limitiert die Transkription von <i>isl1</i> am venösen Pol	68
2.1.16. Der Verlust der <i>isl1</i> -Funktion kompensiert den Überschuss an atrialen Kardiomyozyten in <i>cfl2</i> -Morphanten	69
2.1.17. Überexpressionsstudien von <i>cfl2</i> während der Herzentwicklung	72
2.1.18. Der <i>Knockdown</i> und die Überexpression von <i>cfl2</i> beeinträchtigen die Organisation der Aktinfilamente	73
2.2. Cofilin 2 reguliert die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie im Zebrafisch	74
2.2.1. Cofilin 2 vermittelt die Lateralität des Herzens	74
2.2.2. Cofilin 2 steuert die Links-Rechts-Asymmetrie der viszerale Organe	75
2.2.3. Die asymmetrische <i>spaw</i> -Expression steht unter dem Einfluss der <i>cfl2</i> -Funktion	76
2.2.4. <i>Cfl2</i> wird in den DFCs und im Kupfferschen Vesikel exprimiert	77
2.2.5. Cofilin 2 steuert zellautonom die Etablierung der embryonalen Lateralität	78
2.2.6. Cofilin 2 kontrolliert die Entwicklung des Kupfferschen Vesikels	81
2.2.7. Cofilin 2 kontrolliert die Morphologie des Kupfferschen Vesikels	83
2.2.8. Cofilin 2 wird für ein funktionsfähiges Kupffersche Vesikel benötigt	84
2.2.9. Cofilin 2 kontrolliert die Clusterbildung der DFCs	84
2.2.10. Separierte DFCs der <i>cfl2</i> -Morphanten durchlaufen Apoptose	86
2.2.11. Cofilin 2 und Integrin- α V1 steuern synergistisch die DFC-Clusterbildung	86
2.2.12. Cofilin 2 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin in den DFCs	89
2.2.13. Die Überexpression von <i>cfl2</i> stört die Entwicklung der Links-Rechts-Asymmetrie	89
2.2.14. Der <i>Knockdown</i> und die Überexpression von <i>cfl2</i> haben keine drastische Veränderung des F-Aktinlevels zur Folge	92
3. DISKUSSION	93
3.1. Cofilin 2 und Alcama kontrollieren synergistisch die Herzmorphogenese im Zebrafisch	94
3.2. Cofilin 2 wird im frühen Zebrafisch- und Mausembryo exprimiert	96
3.3. Cofilin 2 reguliert die Anzahl der Kardiomyozyten im Zebrafischembryo	98
3.3.1. Cofilin 2 fördert die Differenzierung von Kardiomyozyten am arteriellen Pol	98
3.3.2. Cofilin 2 limitiert die Anzahl der Kardiomyozyten am venösen Pol	101
3.4. Cofilin 2 reguliert die Links-Rechts-Körperasymmetrie im Zebrafisch	104
3.5. Die Überexpression und der Knockdown von <i>cfl2</i> stören die Aktindynamik	109
3.6. Ausblick	111

4. MATERIALIEN	113
4.1. Chemikalien	114
4.2. Kits	116
4.3. Enzyme	116
4.4. Farbstoffe, Inhibitoren	116
4.5. Antikörper	117
4.6. Geräte	118
4.7. Zubehör	119
4.8. Puffer, Lösungen	119
4.9. Vektoren	121
4.10. Synthetische Oligonukleotide, Morpholinos	122
4.11. Organismen	123
5. METHODEN	124
5.1. Molekularbiologische Methoden	125
5.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	125
5.1.2. Ligation	126
5.1.3. RNA-Isolierung	126
5.1.4. Reverse-Transkription (RT)	127
5.1.5. Sonden-Synthese	127
5.1.6. <i>In vitro</i> -Transkription	129
5.1.7. Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren	129
5.1.8. BrdU-Proliferationstest	130
5.1.9. TUNEL	130
5.2. Mikrobiologische Methoden	131
5.2.1. Transformation chemisch kompetenter Bakterien	131
5.3. Zellbiologische Methoden	132
5.3.1. Kultivierung und transiente Transfektion von HEK293T Zellen	132
5.4. Entwicklungsbiologische Methoden	132
5.4.1. Haltung und Züchtung der Zebrafärblinge	132
5.4.2. Mikroinjektion	133
5.4.3. Injektion der fluoreszierenden Beads	134
5.4.4. Behandlung der Zebrafärblingembryonen mit Cytochalasin D und Latrunculin B	135
5.4.5. Immunfluoreszenz-, TO-PRO-3- und Rhodamin-Phalloidin-Färbung	135
5.4.6. <i>Whole Mount in situ</i> -Hybridisierung (WISH)	136
5.4.7. DAF-FM Markierung	137
5.4.8. Konfokale Mikroskopie	138
5.5. Proteinchemische Methoden	138
5.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	138
5.5.2. Western Blot (WB)	139
5.5.3. Strippen von WB-Membranen	140
5.5.4. Immunpräzipitation	140
5.5.5. Co-Immunpräzipitation	141
5.5.6. Massenspektrometrie	141

5.6. Bioinformatische Methoden	142
5.6.1. Verwendete Programme	142
5.6.2. Quantifizierung der Kardiomyozyten	142
ABKÜRZUNGEN	143
LITERATUR	148
LEBENS LAUF	165
VERÖFFENTLICHUNGEN	166
TEILNAHME AN WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNGEN	167
DANKSAGUNG	168
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	169

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.	Embryogenese des Zebrabärblings.	17
Abbildung 2.	Kardiogenese im Zebrabärbling.	20
Abbildung 3.	Zelluläre Hierarchie der kardiovaskulären Vorläuferzellen.	22
Abbildung 4.	Alcam vermittelt homo- und heterophile Interaktionen.	25
Abbildung 5.	Alcama kontrolliert die Herzmorphogenese im Zebrabärblingembryo.	27
Abbildung 6.	Der Rho/Aktin/MRTF-Signalweg kontrolliert die SRF-vermittelte Genexpression.	29
Abbildung 7.	Die Planare-Zellpolaritäts-Signaltransduktionskaskade.	30
Abbildung 8.	Konzentrationsabhängige Aktivität von ADF/Cofilin.	34
Abbildung 9.	Regulation von ADF/Cofilin-Kinasen und -Phosphatasen.	35
Abbildung 10.	Zwei Modelle zur Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie durch den <i>Nodal Flow</i> .	39
Abbildung 11.	Die Bildung des Kupfferschen Vesikels aus DFCs im Zebrabärblingembryo.	40
Abbildung 12.	Etablierung der asymmetrischen Genexpression im Maus- und Zebrabärblingembryo.	43
Abbildung 13.	Cofilin 2 interagiert mit Alcama.	48
Abbildung 14.	Expressionsmuster von <i>cf12</i> im Zebrabärblingembryo.	49
Abbildung 15.	Nachweis der <i>cf12</i> -Expression im frühen Zebrabärbling- und Mausembryo.	50
Abbildung 16.	Morpholino-vermittelter Knockdown von <i>cf12</i> im Zebrabärbling.	52
Abbildung 17.	Phänotyp von <i>cf12</i> -Morphanten während der Segmentierungsphase.	53
Abbildung 18.	Herzphänotyp der <i>cf12</i> -Morphanten.	54
Abbildung 19.	Ventrikuläre Kardiomyozyten der <i>cf12</i> -Morphanten weisen eine anormale Morphologie und eine veränderte Alcama-Lokalisation auf.	55
Abbildung 20.	Der Verlust von <i>cf12</i> führt zu Herzkammer-spezifischen Veränderungen der Kardiomyozytenzahlen.	57
Abbildung 21.	Aktin-Inhibitoren beeinträchtigen nicht die Anzahl der Kardiomyozyten im sich entwickelnden Herzen.	58
Abbildung 22.	Reduzierte <i>vmhc</i> -Expression ab 28 hpf in <i>cf12</i> -Morphanten.	60
Abbildung 23.	Nachweis der kardiovaskulären Vorläuferzellen am arteriellen Pol der <i>cf12</i> -Morphanten.	62
Abbildung 24.	Der <i>Knockdown</i> von <i>cf12</i> hat keine Auswirkungen auf die Endothelzellen im Ausflusstrakt.	63
Abbildung 25.	Reduzierter Bulbus Arteriosus in <i>cf12</i> -Morphanten.	64
Abbildung 26.	Reduzierte <i>mef2cb</i> -Expressionsdomäne in <i>cf12</i> -Morphanten.	65
Abbildung 27.	Vergrößerte <i>amhc</i> -Expressionsdomäne in <i>cf12</i> -Morphanten bei 28 hpf.	66
Abbildung 28.	Unveränderte Proliferation atrialer Zellen in <i>cf12</i> -Morphanten.	67

Abbildung 29.	Erhöhte Anzahl an Isl ⁺ -Kardiomyozyten am venösen Pol der <i>cf/2</i> -Morphanten.	68
Abbildung 30.	Expansion von <i>isl1</i> -exprimierenden Zellen am venösen Pol der <i>cf/2</i> -Morphanten.	69
Abbildung 31.	Der <i>Knockdown</i> von <i>isl1</i> kompensiert den Überschuss an atrialen Kardiomyozyten in <i>cf/2</i> -Morphanten.	71
Abbildung 32.	Effekt der <i>cf/2</i> -Überexpression auf die Herzentwicklung.	73
Abbildung 33.	Die Injektion der <i>cf/2</i> -mRNA erzielte keine Rettung der <i>cf/2</i> -Morphanten.	73
Abbildung 34.	Der <i>Knockdown</i> und die Überexpression von <i>cf/2</i> beeinträchtigen die Organisation von Aktinfilamenten in der Skelettmuskulatur.	74
Abbildung 35.	<i>Cf/2</i> -Morphanten weisen Defekte in der Links-Rechts-Herzasymmetrie auf.	75
Abbildung 36.	<i>Cf/2</i> -Morphanten weisen eine aberrante Links-Rechts-Asymmetrie der viszerale Organe auf.	76
Abbildung 37.	<i>Cf/2</i> -Morphanten weisen eine randomisierte <i>spaw</i> -Expression auf.	77
Abbildung 38.	<i>Cf/2</i> wird in DFCs und im KV exprimiert.	78
Abbildung 39.	Cofilin 2 reguliert zellautonom die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie.	80
Abbildung 40.	Die Entwicklung des Kupfferschen Vesikels ist in <i>cf/2</i> -Morphanten beeinträchtigt.	82
Abbildung 41.	<i>Cf/2</i> -Morphanten weisen eine anormale Morphologie des Kupfferschen Vesikels auf.	83
Abbildung 42.	Fehlender Flüssigkeitsstrom innerhalb des KV <i>cf/2</i> -defizienter Embryonen.	84
Abbildung 43.	Normale DFC-Spezifizierung und defekte DFC-Clusterbildung in <i>cf/2</i> -Morphanten.	85
Abbildung 44.	Detektion von apoptotischen DFCs in <i>cf/2</i> -Morphanten.	86
Abbildung 45.	Cofilin 2 und Integrin- α V1 interagieren während der Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie.	88
Abbildung 46.	Der <i>Knockdown</i> von <i>cf/2</i> hat keine Auswirkungen auf die Lokalisation von E-Cadherin in den DFCs.	89
Abbildung 47.	<i>Cf/2</i> -Überexpression führt zur anormalen Links-Rechts-Asymmetrie.	91
Abbildung 48.	Der <i>Knockdown</i> und die Überexpression von <i>cf/2</i> führen nicht zum Abbau der Aktinfilamente.	92
Abbildung 49.	Modell zur funktionellen Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 bei der Regulation der Herzmorphogenese.	96
Abbildung 50.	Modell zur Funktion von Cofilin 2 bei der Kontrolle der Kardiomyozytenzahl.	104
Abbildung 51.	Modell zur Funktion von Cofilin 2 bei der Regulation der Links-Rechts-Achsen-determinierung.	109
Abbildung 52.	Reaktionsschema für die NO-Detektion durch DAF-FM.	138

ZUSAMMENFASSUNG

Eine präzise Regulation der kardialen Morphogenese sichert eine effektive Herzfunktion. Im Vorfeld dieser Arbeit zeigte Dr. Benno Jungblut, dass das Zelladhäsionsmolekül Alcama (engl.: *activated leukocyte cell adhesion molecule a*) für die morphogenetischen Prozesse im Herzen des Zebrafischembryos unerlässlich ist (unveröffentlichte Daten). Um die zellbiologische Grundlage der Alcama-vermittelten Adhäsion zu entschlüsseln, sollten im Rahmen dieser Arbeit neue Interaktionspartner von Alcama identifiziert und charakterisiert werden. Durch Immunpräzipitation in Kombination mit massenspektrometrischer Analyse wurde das Aktin-regulatorische Protein Cofilin 2 als ein neuer Interaktionspartner von Alcama detektiert. Im Gegensatz zu der ubiquitären Isoform Cofilin 1 ist die Funktion der muskelspezifischen Form Cofilin 2 während der Embryonalentwicklung nur wenig erforscht. Daher lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der funktionellen Charakterisierung von Cofilin 2 im Zebrafischembryo. Hier durchgeführte RNA-Expressionsstudien zeigten eine zunächst ubiquitäre Expression von *cofilin 2 (cfl2)*, die während der Segmentierungsphase auf die Augenlinsen, skelettale und kardiale Muskulatur, sowie das zentrale Nervensystem begrenzt wird. Mit Hilfe des Morpholino-vermittelten *Knockdowns* von *cfl2* konnte nachgewiesen werden, dass dieses Aktin-bindende Protein die morphologischen Veränderungen myokardialer Zellen während der Schleifenbildung des Herzens kontrolliert. Weiterhin wird seine Funktion in dieser Entwicklungsphase für die korrekte Lokalisation von Alcama in der ventrikulären Kardiomyozytenmembran benötigt. Darüber hinaus ergaben immunchemische und konfokal-mikroskopische Untersuchungen, dass Cofilin 2 die Anzahl der Kardiomyozyten Herzkammer-spezifisch reguliert. Dabei limitiert Cofilin 2 in Abhängigkeit von Islet 1 die Differenzierung von Kardiomyozyten am venösen Pol, während es am arteriellen Pol die Mef2cb-abhängige Differenzierung von Kardiomyozyten sowie von glatten Muskelzellen des Bulbus Arteriosus fördert.

Des Weiteren ist Cofilin 2 an der Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie beteiligt. Mittels *in situ*-Hybridisierungen wurde eine randomisierte Expression des ersten asymmetrischen Markers *southpaw* infolge der *cfl2*-Defizienz festgestellt. Die asymmetrische Genexpression wird im Zebrafischembryo durch das Kupffersche Vesikel (KV) etabliert, dessen Monozilien einen linksgerichteten Flüssigkeitsstrom erzeugen. Eine phänotypische Charakterisierung der *cfl2*-defizienten Embryonen während der Gastrulation und der frühen

Segmentierungsperiode brachte die Erkenntnis, dass Cofilin 2 für die Entwicklung eines funktionsfähigen KV benötigt wird. Cofilin 2 kontrolliert dabei die Clusterbildung und sichert das Überleben der KV-Vorläuferzellen, den DFCs (engl.: *dorsal forerunner cells*). Zusätzlich konnte hier durch einen Doppel-*Knockdown* gezeigt werden, dass Cofilin 2 in den Integrin- α V1-vermittelten Signalweg involviert ist, um die Bildung des DFC-Clusters zu gewährleisten.

SUMMARY

Precise regulation of heart morphogenesis ensures effective cardiac function. Previous work by Dr. Benno Jungblut has shown that activated leukocyte cell adhesion molecule a (Alcama) plays a critical role during morphogenetic processes in the zebrafish heart (unpublished data). To elucidate the cellular mechanism underlying Alcama-mediated adhesion, a screening was performed to identify proteins that interact with Alcama. Immunoprecipitation followed by mass spectrometry analysis revealed the actin-modulating protein Cofilin 2 as a novel interacting partner of Alcama. Whereas ubiquitously expressed Cofilin 1 is the best studied isoform, little is known about the muscle-type Cofilin 2 during embryogenesis. Therefore, the focus of the present work was the functional characterization of Cofilin 2 in zebrafish embryos. Gene expression studies revealed ubiquitous *cofilin 2 (cfl2)* expression until segmentation stages, which is then restricted to skeletal and cardiac muscles, lenses and the central nervous system. Morpholino-mediated knockdown of *cfl2* showed that this actin-binding protein controls morphological changes of myocardial cells during cardiac looping and chamber formation. Furthermore, Cofilin 2 is required to regulate the subcellular localization of Alcama in ventricular cardiomyocytes at the same stage. In addition, immunochemistry and confocal microscopy revealed that Cofilin 2 regulates the cardiomyocyte number in a chamber-specific manner. Cofilin 2 is required to restrict the differentiation of atrial cardiomyocytes at the venous pole in an Islet 1-dependent manner. In contrast, Cofilin 2 is important for promoting the Mef2cb-dependent differentiation of ventricular cardiomyocytes as well as smooth muscle cells of the bulbus arteriosus at the arterial pole.

In addition, this work demonstrated that Cofilin 2 plays a role in determination of left/right asymmetry of the heart and other visceral organs. Whole mount *in situ* hybridizations of *cfl2*-deficient embryos showed a randomized expression of the Nodal-homolog *southspaw*, the first marker for left-right asymmetry. In zebrafish embryos asymmetric gene expression is established by Kupffer's vesicle (KV), a ciliated organ generating a leftward fluid flow. Phenotypic characterization of *cfl2*-deficient embryos during the gastrulation and early segmentation stages showed that Cofilin 2 is essential for the formation of a functional KV. Cofilin 2 controls the clustering and ensures the survival of the dorsal forerunner cells (DFCs), precursors of KV. Furthermore, a double knockdown demonstrated that Cofilin 2 is

involved in Integrin- α V1-mediated signaling pathway during the regulation of the clustering of DFCs.

1. EINLEITUNG

1.1. Der Zebrafärbling als Modellorganismus

In den vergangenen Jahren ist der Zebrafärbling (*Danio rerio*) zu einem wichtigen Modellorganismus in der Entwicklungsbiologie und Genetik avanciert. Dieser zeichnet sich durch seine kurze Embryogenese (drei Tage) und Generationszeit (Geschlechtsreife nach etwa drei Monaten), platzsparende und kostengünstige Haltung, extrakorporale Entwicklung, Transparenz der Embryonen und große Anzahl an Nachkommen (ein Weibchen kann ca. 300 Eier pro Woche ablaichen) aus. Im Vergleich zu anderen Vertebratenmodellen ist der Zebrafärbling darüber hinaus für genetische Manipulationen leicht zugänglich. Die Generierung transgener Fischlinien, Mutagenese-Studien und RNA-Überexpressionen können recht einfach durchgeführt werden (z. B. in Higashijima *et al.*, 1997; Driever *et al.*, 1996). Für die gezielte, transiente Geninaktivierung steht die Morpholino-basierte *Antisense*-Technologie zur Verfügung (siehe 5.4.2.), die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde. Der Zebrafärbling erweist sich vor allem für *in vivo*-Untersuchungen der embryonalen Herzentwicklung von Vertebraten als ein geeignetes Modellsystem. Der Zebrafärbling bietet den großen Vorteil, dass die Embryonen nicht von einem intakten Herz-Kreislaufsystem abhängig sind. Der Sauerstoffbedarf kann durch passive Diffusion sichergestellt werden. Entsprechend kann sich ein Embryo mit kardiovaskulären Defiziten und fehlender Blutzirkulation bis zu mehreren Tagen weiterentwickeln (Chen *et al.*, 1996; Vogel und Weinstein, 2000). Dies ermöglicht eine detaillierte Charakterisierung des pathologischen Phänotyps.

Im Vergleich zu dem vierkammerigen Säugetierherz weist der Zebrafärbling ein einfach aufgebautes Herz auf, das nur einen Ventrikel und ein Atrium besitzt. Trotz der anatomischen Unterschiede des vollentwickelnden Herzens zwischen den etablierten Modellorganismen Zebrafärbling und Maus sind die fundamentalen Entwicklungsprozesse unter den Vertebraten konserviert (Lohr und Yost, 2000; siehe 1.3.). Demnach lassen sich viele der im Zebrafärbling gewonnenen Erkenntnisse auf die Säugetiere übertragen.

1.2. Die Embryonalentwicklung des Zebrafärblings

Nach der Fertilisation der dotterreichen Oocyte durchläuft die Zygote meroblastische Furchungsteilungen, die sich auf die Zytoplasmascheibe am animalen Pol beschränken (Kimmel *et al.*, 1995; Abb. 1A-D). Im 512-Zellstadium der Blastula entwickelt sich

extraembryonales Gewebe, die synzytiale Dotterzellschicht (engl.: *yolk syncytial layer*, YSL). Zudem unterscheidet man in diesem Entwicklungsstadium die Hüllschicht, die sich an der Oberfläche des Blastoderms befindet (engl.: *enveloping layer*, EVL) sowie die Tiefenzellen (engl.: *deep cell layer*, DEL), aus denen der eigentliche Embryo hervorgeht (Abb. 1E'). In der späten Blastula, ca. 4 Stunden nach der Befruchtung (engl.: *hours post fertilization*, hpf), werden die ersten Zellbewegungen eingeleitet. Dabei breitet sich das Blastoderm über die Dotterkugel zum vegetativen Pol aus, ein Vorgang, der als Epibolie bezeichnet wird (Abb. 1E-H). Nachdem die Blastodermzellen die Hälfte der Dotterzelle umhüllt haben (50 % Epibolie, 5,5 hpf), setzt die Gastrulation ein (Solnica-Krezel und Driever, 1994). Während die Epibolie weiter voranschreitet, werden durch Involution und konvergente Extension die drei Keimblätter gebildet und die embryonalen Achsen festgelegt. Etwa 6 hpf ist zum ersten Mal die Ausrichtung des Embryos in ventral-dorsale, sowie anterior-posteriore Richtung möglich. Die zukünftige dorsale Seite des Embryos wird durch den sogenannten Embryonalschild (engl.: *embryonic shield*) definiert, das Äquivalent zum Spemann-Organisator der Amphibien (Abb. 1F). Durch die konvergente Ausdehnung bildet sich an der dorsalen Mittellinie der Keimstreifen, aus dem der Embryo hervorgeht. Die Gastrulation ist nach zehn Stunden abgeschlossen, wenn der Embryo den gesamten Dotter umhüllt hat (100 % Epibolie). Dieses Stadium wird auch *Tailbud* (*Bud*) genannt, weil jetzt die Schwanzknospe am kaudalen Ende der embryonalen Achse sichtbar ist, während der Kopf am ehemals animalen Pol zu erkennen ist (Abb. 1H). Anschließend folgt die Segmentierungsperiode, die den zeitlichen Rahmen zwischen 10 und 24 hpf umfasst. Diese Entwicklungsphase wird durch die Unterteilung der einzelnen Körperregionen charakterisiert, wie die gleichmäßige Segmentierung des Mesoderms in Somiten und die Neurulation. (Abb. 1I, J). Parallel dazu zieht sich der Embryo entlang der anterior-posterioren Körperachse in die Länge und die meisten Organe sind angelegt. Die Stadienbestimmung erfolgt jetzt nach der Anzahl der Somiten. Im 17-Somitenstadium (17,5 hpf) werden erste schwache Muskelkontraktionen sichtbar. Nach 22 hpf (26-Somitenstadium) beginnt das Herz zu schlagen. An die Segmentierungsphase schließt sich die Pharyngualperiode (24-48 hpf) an, in der die Körpergestalt etabliert wird (Abb. 1K). Diese Entwicklungsphase zeichnet sich durch die Ausbildung der sieben Kiemenbögen (engl.: *pharyngeal arches*) aus. Außerdem erfolgt die Streckung der Körperlängsachse und die Pigmentierung setzt ein. Zur Bestimmung der Entwicklungsstadien dient jetzt der Kopf-Rumpf-Winkel, der mit fortschreitender

Entwicklung zunimmt (Abb. 1M). Am dritten Tag ist die Morphogenese der meisten Organe weitgehend abgeschlossen (Abb. 1L). Die Larve schlüpft aus dem Chorion und entwickelt sich nach drei bis vier Monaten zum geschlechtsreifen Tier (Kimmel *et al.*, 1995).

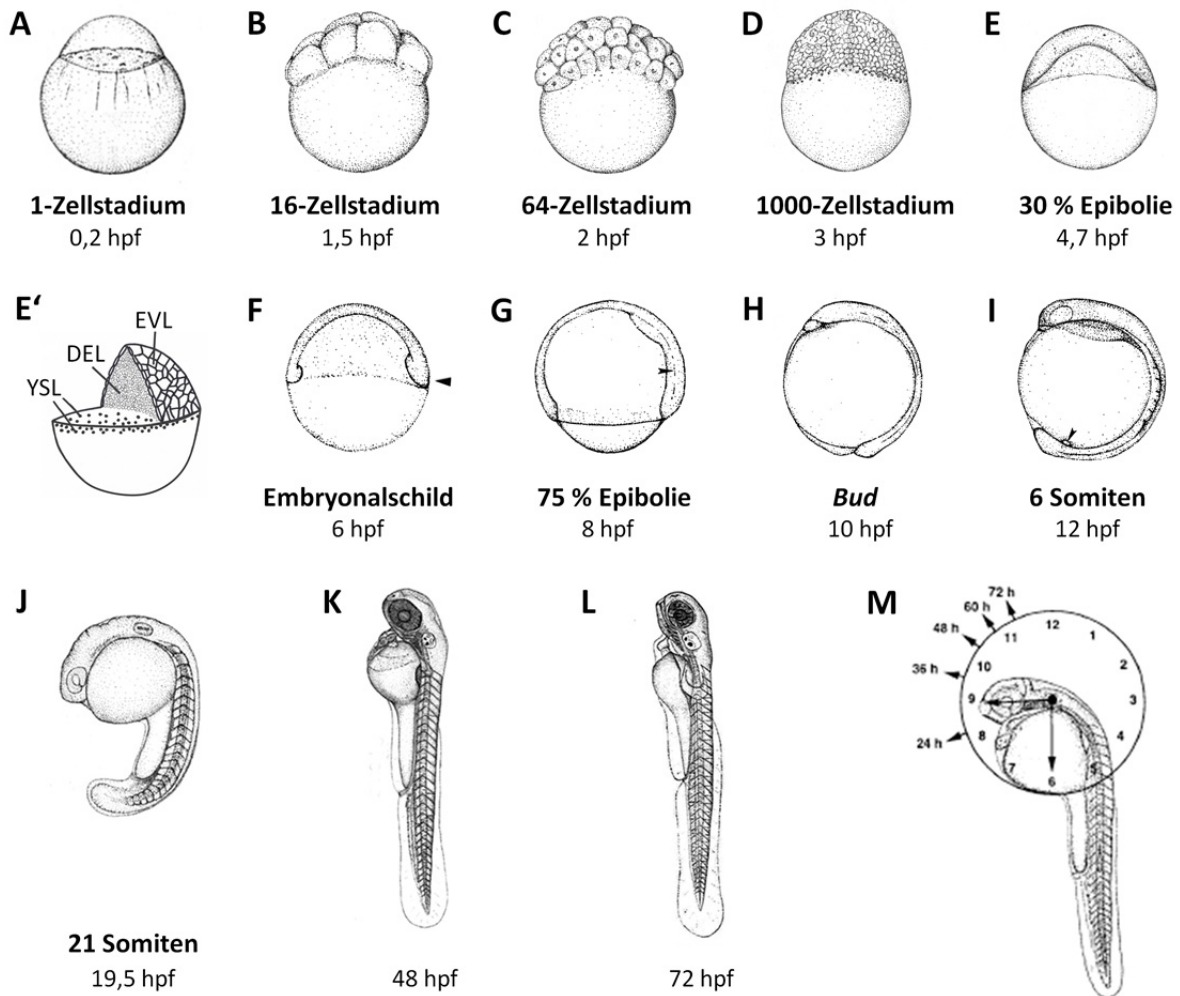


Abbildung 1. Embryogenese des Zebrafischs.

(A-M) Die Entwicklung des Zebrafischembryos vollzieht sich von der Zygote bis zum Schlüpfen der Larve innerhalb von drei Tagen. Nach der Befruchtung durchläuft die Zygote mehrere Furchungsteilungen (A-D). Durch die Epibolie breitet sich das Blastoderm über den Dotter aus (E-H). E' zeigt einen Querschnitt durch den animalen Pol mit den drei Zellpopulationen bei 30 % Epibolie: synzytiale Dotterzellschicht (YSL), die Hüllschicht (EVL) und die Tiefenzellen (DEL). Die Pfeilspitzen in F und G markieren jeweils den Embryonalschild und die Streckung der anterior-posterioren Embryonalachse. In der Segmentierungsphase bilden sich die Somiten, deren Anzahl das jeweilige Entwicklungsstadium bestimmt (I, J). Die Pfeilspitze in I markiert das Kupffersche Vesikel (siehe 1.8.). Am zweiten und dritten Tag streckt sich der Embryo (K, L), dabei erfolgt die Stadienbestimmung nach der Ausrichtung des Kopfes im Verhältnis zu der Körperachse (M). In A-H ist der animale Pol nach oben orientiert; I-M zeigen eine laterale Ansicht, der anteriore Pol ist nach oben orientiert. Modifiziert nach Kimmel *et al.*, 1995.

1.3. Kardiogenese im Zebrabärblingembryo

Wie bei allen Vertebraten ist das Herz das erste Organ, das seine Funktion während der Embryonalentwicklung im Zebrabärbling aufnimmt. Die Kardiogenese beginnt mit der Spezifizierung der kardialen Vorläuferzellen in der frühen Blastula (512-Zellstadium, 2,75 hpf). Der Anlagenplan (engl.: *fate map*) zeigt die kardialen Vorläuferzellen in der lateralen Marginalzone auf jeder Seite des Blastoderms (Stainier *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den endokardialen konnte den myokardialen Vorläuferzellen eine spezifische räumliche Organisation in der späten Blastula (40 % Epibolie, 5 hpf), kurz vor der Initiation der Gastrulation, zugewiesen werden. Myokardiale Vorläuferzellen des zukünftigen Ventrikels sind dorsaler und näher zur Marginalzone als die atrialen Vorläuferzellen lokalisiert (Keegan *et al.*, 2004; Abb. 2A). Nach der Involution konvergieren die kardialen Vorläuferzellen zur embryonalen Achse und erreichen ihren Bestimmungsort im anterioren, lateralen Plattenmesoderm (ALPM) an der zukünftigen Mittelhirn-Hinterhirn-Grenze im 5-Somitenstadium (etwa 12 hpf). Während der morphogenetischen Bewegungen bleiben die Herzvorläuferzellen untereinander kohärent, so dass sie auch nach der Gastrulation ihre räumliche Organisation beibehalten. Die myokardialen Vorläuferzellen, die sich später zum Ventrikel entwickeln, befinden sich im Vergleich zu den atrialen Vorläuferzellen der embryonalen Mittellinie am nächsten (Schoenebeck und Yelon, 2007; Abb. 2B). Die myokardiale Differenzierung setzt mit der Expression von *myl7* (leichte Myosinkette Polypeptid 7; engl.: *myosin light chain polypeptide 7*; auch als *cmlc2* bezeichnet, engl.: *cardiac myosin light chain 2*) im 13- bis 14-Somitenstadium (etwa 16 hpf) ein. Zeitgleich wird auch die Expression von *vmhc* (Ventrikel-spezifische schwere Myosinkette; engl.: *ventricular myosin heavy chain*) eingeleitet (Yelon *et al.*, 1999). Die Expression von *amhc* (Atrium-spezifische schwere Myosinkette; engl.: *atrial myosin heavy chain*) beginnt im 19-Somitenstadium des Zebrabärblingembryos, etwa drei Stunden nach der Initiierung der *vmhc*-Expression (Berdougo *et al.*, 2003). Während der Segmentierungsperiode konvergieren die bilateralen Zellpopulationen zur Mittellinie und fusionieren, um eine kegelförmige Struktur aus myokardialem Gewebe zu bilden (engl.: *cardiac cone*). Die endokardialen Vorläuferzellen wandern dabei voraus und werden von myokardialen Zellen nach der kardialen Fusion eingeschlossen. Der zukünftige Ventrikel geht aus dem zentralen Bereich des *Cardiac Cones* hervor, während das Atrium aus den Zellen der Peripherie gebildet wird (Stainier, 2001; Abb. 2C). In den nächsten Stunden durchläuft das myokardiale

Gewebe eine asymmetrische Involution, die zur Ausbildung eines schlauchförmigen Herzens in links-anteriore Richtung führt (Rohr *et al.*, 2008; Abb. 2D). Der Herzschauch des Zebrabärblingembryos wächst durch sukzessive Differenzierung von in die Herzanlage einwandernden Vorläuferzellen. Dabei beginnt dieser kontinuierliche Differenzierungsprozess im Ventrikel und setzt sich im Atrium fort (Abb. 2E). Proliferation trägt nur zu einem sehr geringen Anteil zum Wachstum des Herzens bei. Wenn der Herzschauch beginnt sich zu krümmen, werden neue Kardiomyozyten zum arteriellen Pol rekrutiert, um den Ausflusstrakt zu formen (de Pater *et al.*, 2009; Abb. 2F). Durch die Schleifenbildung (engl.: *cardiac looping*) des linearen Herzschauchs wird der kardiale Reifungsprozess eingeleitet und die endgültige Position der Herzkammern festgelegt. Dabei wandert der Ventrikel zur rechten Seite, während das Atrium auf der linken Seite bleibt (Abb. 2G). Zeitgleich unterliegt der Herzschauch einer Reihe komplexer, morphogenetischer Schritte, die zur Bildung der zwei Herzkammern mit teilweise gestreckten Kardiomyozyten führen (Bakkers *et al.*, 2011). Kurz nach der kardialen Fusion setzen die zunächst unregelmäßigen Kontraktionen der Kardiomyozyten ein. Im weiteren Verlauf der Herzmorphogenese liegt das Herz als peristaltisch kontrahierender Herzschauch vor, der sich nach zwei Tagen zu einem sequentiell kontrahierenden Zweikammerherz mit erhöhter Herzschlagfrequenz entwickelt. Die Schrittmacherzellen befinden sich am venösen Pol und werden zuletzt zum Herzschauch rekrutiert (Bakkers *et al.*, 2011). Nach 48 hpf entwickelt sich eine dickwandige Kammer zwischen dem Ventrikel und der ventralen Aorta, der sogenannte Bulbus Arteriosus. Dieser setzt sich aus glatter Muskulatur und elastischen Fasern zusammen, um den durch die Systole verursachten Druck aufzufangen („Windkesselfunktion“; Grimes *et al.*, 2006). Bis zu diesem Zeitpunkt verlaufen die grundlegenden Prozesse der Kardiogenese bei allen Vertebraten gleich. Während diese jedoch im Zebrabärblingembryo an diesem Punkt abgeschlossen sind, entwickeln die höheren Vertebraten (Reptilien, Vögel und Säugetiere) ein weiteres Kreislaufsystem (pulmonaler Kreislauf).

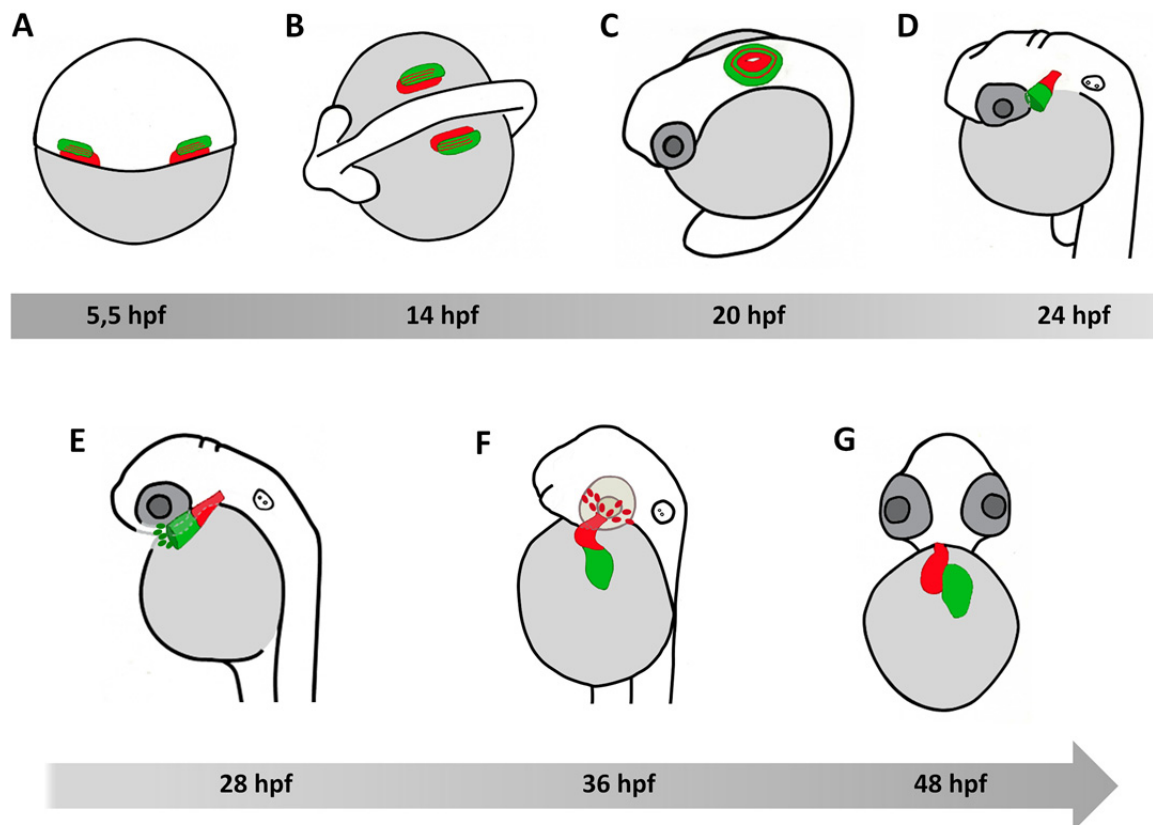


Abbildung 2. Kardiogenese im Zebrafärbling.

(A-G) Schematische Darstellung der wichtigen Entwicklungsphasen während der Kardiogenese im Zebrafärbling zu den angegebenen Zeitpunkten. Die myokardialen Vorläuferzellen migrieren im Zuge der Gastrulation zum ALPM (A-B). Die bilateralen Herzfelder konvergieren zur Mittellinie, fusionieren und bilden den *Cardiac Cone* (C). Durch die asymmetrische Involution des myokardialen Gewebes formt sich der lineare Herzschlauch (D), der sich durch die kontinuierliche Differenzierung von Kardiomyozyten verlängert (E). Der Ausflusstrakt wird durch die Rekrutierung neuer Kardiomyozyten zum arteriellen Pol gebildet (F). Durch die Schleifenbildung und eine Reihe morphogenetischer Prozesse entsteht das Zweikammerherz des Zebrafärblings (G). Die ventrikulären sind rot und die atrialen Vorläuferzellen (A-B) bzw. Kardiomyozyten (C-G) grün markiert. (A) der animale Pol ist nach oben orientiert; (B-D) dorsal-laterale Ansicht, die linke Körperseite ist frontal orientiert; (E) laterale Ansicht; (F) ventral-laterale Ansicht; (G) ventrale Ansicht.

1.4. Das zweite Herzfeld

Das Herz der Vögel und Säugetiere wird aus zwei Quellen von kardialen Vorläuferzellen generiert, die als erstes (engl.: *first heart field*, FHF) und zweites Herzfeld (engl.: *second heart field*, SHF) bezeichnet werden. Das FHF ist die erste Zellpopulation myokardialer Vorläufer, die im ALPM aus splanchnischem Mesoderm differenzieren. Diese bilden die sichelförmige Herzanlage (engl.: *cardiac crescent*) und den linearen Herzschlauch, aus dem schließlich der linke Ventrikel und Teile der atrialen Herzkammern hervorgehen. Das SHF stammt aus pharyngealem Mesoderm und ist medial zur sichelförmigen Herzanlage lokalisiert. Zellen aus dem SHF werden an beide Pole des linearen Herzschlauchs hinzugefügt

und formen im weiteren Verlauf der Kardiogenese den Ausflusstrakt, den rechten Ventrikel und den größten Teil des atrialen Gewebes (Buckingham *et al.*, 2005; Vincent und Buckingham, 2010).

1.4.1. SHF im Zebrafärbling

Mehrere Studien der letzten Jahre konnten den Nachweis für die Existenz des SHF auch im Zebrafärblingembryo erbringen, obwohl dieser nur einen primitiven Ausflusstrakt und keinen rechten Ventrikel besitzt (de Pater *et al.*, 2009; Hami *et al.*, 2011; Lazic und Scott, 2011; Zhou *et al.*, 2011; Hinitz *et al.*, 2012; Witzel *et al.*, 2012). Zudem scheinen die molekularen Mechanismen, die der SHF-Entwicklung zugrunde liegen, unter den Vertebraten hochkonserviert zu sein. Den ersten Hinweis für das Fisch-SHF erbrachte die Identifizierung der zwei Populationen myokardialer Zellen im embryonalen Zebrafärblingherzen. Während aus der ersten Zellpopulation der lineare Herzschauch hervorgeht, bildet anschließend die zweite Zellpopulation das Myokard des arteriellen Pols (de Pater *et al.*, 2009). Im Jahr 2011 beschrieben drei Studien das SHF des Zebrafärblingembryos als eine Zellpopulation myokardialer Vorläufer, die in der extrakardialen, zum arteriellen Pol angrenzenden Region lokalisiert ist (Hami *et al.*, 2011; Lazic und Scott, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Analog zu den Erkenntnissen in höheren Vertebraten konnte durch die Verfolgung individueller Zellschicksale (engl.: *lineage tracing*) im Zebrafärbling gezeigt werden, dass die kardialen Vorläuferzellen des SHF zu distinkten Herzkompartmenten beitragen. Aus den SHF-Zellen, die im Zebrafärblingembryo durch die Expression des latenten TGF β -Bindoproteins 3 (engl.: *latent TGF- β binding protein 3*, *Ltbp3*) gekennzeichnet werden, geht das Myokard der distalen Ventrikelhälfte hervor, sowie die Endothel-, glatten Muskel- und myokardialen Zellen des Ausflusstraktes (Zhou *et al.*, 2011). Diese *Ltbp3*-positive Zellpopulation des Zebrafärblings hat viele Eigenschaften mit dem SHF der Amnieten gemein. Die Entwicklung der vom SHF stammenden Strukturen wird durch ein komplexes, evolutionär konserviertes Netzwerk aus diversen Transkriptionsfaktoren und einer Vielzahl an Signalwegen gesteuert. Bei diesem Prozess werden den Faktoren *Islet 1*, *Mef2c* und *Nkx2-5* eine Schlüsselrolle sowohl in der Maus als auch im Zebrafärbling zugesprochen.

1.4.2. Islet 1

Der LIM-Homöodomäne-Transkriptionsfaktor Islet 1 (*Isl1*) wird im gesamten SHF der Maus exprimiert. Seine Funktion wird für die Proliferation, Aufrechterhaltung und Migration der kardialen Vorläuferzellen des SHF benötigt. Im Mausembryo hat die Defizienz von *Isl1* den Verlust der SHF-Derivate zur Folge (Cai *et al.*, 2003). In den vergangenen Jahren wurde jedoch gezeigt, dass die *Isl1*-Expression nicht auf das SHF beschränkt ist, sondern auch transient im FHF detektierbar ist (Prall *et al.*, 2007; Brade *et al.*, 2007). Untersuchungen an embryonalen Stammzellen konnten belegen, dass *Isl1*-exprimierende Zellen aus dem SHF multipotente, kardiovaskuläre Vorläuferzellen darstellen, die das Potenzial besitzen, zu diversen kardialen Zelltypen zu differenzieren (Moretti *et al.*, 2006). Im Zuge der Zelldeterminierung exprimieren diese *Isl1*-positiven Vorläuferzellen die Transkriptionsfaktoren *Flk1* und *Nkx2-5*. Dabei werden die vaskulären Vorläuferzellen durch die Co-Expression von *Isl1* und *Flk1* gekennzeichnet, aus denen Endothel- und glatte Muskelzellen hervorgehen. *Nkx2-5* und *Isl1*-co-exprimierende Zellen repräsentieren muskuläre Vorläuferzellen, die sich entweder zu kardialen oder glatten Muskelzellen entwickeln können (Abb. 3). Diese zwei Zelltypen können jedoch auch von nur *Nkx2-5*-positiven Zellen stammen (Moretti *et al.*, 2006).

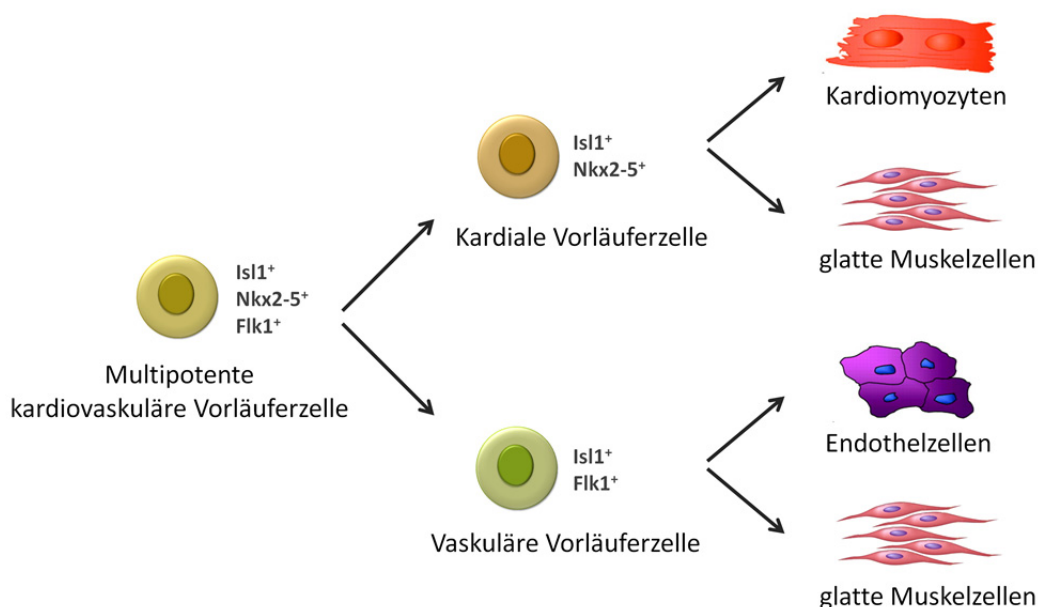


Abbildung 3. Zelluläre Hierarchie der kardiovaskulären Vorläuferzellen.

Die molekulare Signatur *Isl1*⁺/*Nkx2-5*⁺/*Flk1*⁺ definiert multipotente, kardiovaskuläre Vorläuferzellen, die sich zu drei Zelltypen entwickeln können. Die kardialen Vorläuferzellen zeichnen sich durch die Expression von *Isl1* und *Nkx2-5* aus und bringen kardiale und glatte Muskelzellen hervor. Die vaskulären Vorläuferzellen werden durch die Expression von *Isl1* und *Flk1* charakterisiert und können zu Endothelzellen und glatten Muskelzellen der Blutgefäße differenzieren. Modifiziert nach Moretti *et al.*, 2006.

Die Expression von *is/1* wurde ebenfalls in den Vorläuferzellen des SHF am arteriellen Pol des Herzens von Zebrafischembryonen nachgewiesen (Hami *et al.*, 2011). Eine aktuelle Studie dokumentiert zusätzlich eine SHF-Zellpopulation am venösen Pol, die *is/1* exprimiert und nach der ersten Differenzierungsrunde dem venösen Pol hinzugefügt wird (Witzel *et al.*, 2012). Der Verlust der *is/1*-Funktion im Zebrafisch beeinflusst zwar die myokardiale Differenzierung am venösen Pol, hat jedoch keine Auswirkungen auf die Entwicklung des Ausflusstraktes (de Pater *et al.*, 2009). Somit reguliert *Isl1* im Zebrafisch die Vervollständigung der Differenzierung von Kardiomyozyten nur am venösen Pol, während sein Maus-Homolog die Entwicklung sowohl des venösen als auch des arteriellen Pols kontrolliert (Cai *et al.*, 2003).

1.4.3. Mef2c

Ein weiterer Schlüsselregulator des SHF ist der Transkriptionsfaktor Mef2c. Mef2- (engl.: *myocyte enhancer factor 2*) Proteine gehören zu der MADS-Box-Familie und regulieren in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren die Genexpression kontraktile Proteine in kardialen Muskelzellen (Black und Olson, 1998). Mef2c ist für die Entwicklung der aus dem SHF stammenden Strukturen essentiell. Der Verlust seiner Funktion im Mausembryo hat eine defekte Schleifenbildung des Herzens und den Verlust des rechten Ventrikels zur Folge (Lin *et al.*, 1997). Im Zebrafischherz wird die Aktivität von Mef2cb, das Zebrafisch-Homolog zu murinem Mef2c, für die Differenzierung der Kardiomyozyten am arteriellen Pol benötigt (Lazic und Scott, 2011; Hinitz *et al.*, 2012). *Mef2cb*-Expression ist in bilateralen Herzfeldern und im *Cardiac Cone* nachweisbar und ist später auf beide Pole des Herzschlauchs begrenzt (Hinitz *et al.*, 2012). Der Morpholino-vermittelte *Knockdown* von *mef2cb* führt zu einem Verlust vom SHF stammenden Kardiomyozyten am arteriellen Pol sowie zu einer Reduktion des Bulbus Arteriosus (Lazic und Scott, 2011).

1.4.4. Nkx2.5

An der Entwicklung des SHF ist auch der Homöobox-Transkriptionsfaktor Nkx2-5 maßgeblich beteiligt. Nkx2.5, ein Mitglied der Nk2-Familie, kontrolliert die Spezifizierung und Proliferation kardialer Vorläuferzellen und wird sowohl im FHF als auch im SHF der Maus exprimiert (Stanley *et al.*, 2002). Die embryonale Letalität der *Nkx2-5*-Mausmutanten hat ihre Ursache in starken SHF-Defekten, die auf einer beeinträchtigten Proliferation der

Vorläuferzellen beruhen (Prall *et al.*, 2007). Eine kürzlich veröffentlichte Studie demonstriert die konservierte Rolle des Zebrafisch-Homologs Nkx2.5 bei der Entwicklung des SHF (Guner-Ataman *et al.*, 2013). Analog zu den höheren Vertebraten spezifizieren die Vorläuferzellen des Fisch-SHF bereits im ALPM und exprimieren *nkx2.5*. *Nkx2.5*-Morphanten weisen einen Herzphänotyp auf, der durch die fehlenden SHF-Strukturen am arteriellen Pol charakterisiert wird und auf eine reduzierte Proliferation der SHF-Vorläuferzellen zurückzuführen ist (Guner-Ataman *et al.*, 2013).

1.5. Alcam

Strikt regulierte Zelladhäsion bildet die Grundlage für die embryonale Morphogenese. Die adhäsiven Kräfte stellen die Voraussetzung für Zellerkennung, gerichtete Zellmigration, Etablierung der Zellpolarität, Zell-Zell-Kommunikation und Signaltransduktionen dar. Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf der Untersuchung des Zelladhäsionsmoleküls Alcam während der kardialen Morphogenese. Alcam (engl.: *activated leukocyte cell adhesion molecule*) ist ein Transmembranprotein, das unter mehreren Namen bekannt ist. Alcam wurde zuerst im Huhn von drei unterschiedlichen Laboren identifiziert und wurde als DM-GRASP (Burns *et al.*, 1991), SC1 (Tanaka *et al.*, 1991) und BEN (Pourquié *et al.*, 1992) bezeichnet. Orthologe Gene zu Alcam des Huhns wurden in den folgenden Jahren in Nagetieren (KG-CAM, MuSC; Peduzzi *et al.*, 1994; Sekine-Aizawa *et al.*, 1998), im Zebrafisch (Neurolin; Laessing *et al.*, 1994; Kanki *et al.*, 1994) und im Menschen (Alcam, CD166; Bowen *et al.*, 1995) identifiziert.

Als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie weist Alcam eine dafür typische Struktur auf. Das Glykoprotein setzt sich aus fünf extrazellulären Immunglobulin-Domänen, einer Transmembranregion und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne zusammen. Der extrazelluläre Abschnitt ($V_1V_2C_1C_2C_3$) wird weiterhin in zwei N-terminale, variable (V) und drei Membran-proximale, konstante (C) Immunglobulin-Domänen unterteilt. Die intrazelluläre Domäne besteht aus 33 Aminosäuren und ist evolutionär hochkonserviert. Dennoch weist diese keine der bekannten Bindemotive auf, enthält aber ungewöhnlich viele positiv geladene Aminosäuren (50 %), von denen allein 25 % Lysine sind. Mittels Sequenzanalysen konnten keine Konsensus-Sequenzen, wie Tyrosin-, Serin- oder Threonin-Phosphorylierungsstellen oder Anheftungsstellen für das Zytoskelett in der intrazellulären Domäne detektiert werden (Pourquié *et al.*, 1992).

1.5.1. Biologische Funktionen von Alcam

Alcam ist in eine Vielfalt an physiologischen Prozessen involviert, wie die Neurogenese, Hämatopoese, Immunreaktion, und Tumorprogression. Namensgebend für das Protein ist seine Expression von aktivierten Leukozyten. Als eine Reaktion auf die polyklonale Stimulation nimmt die Expression von Alcam rapide zu, das daraufhin durch die Interaktion mit dem *Scavenger*-Rezeptor CD6 (Abb. 4B) die Aktivierung und Proliferation der T-Lymphozyten induziert (Bowen und Aruffo, 1999). Während der neuronalen Entwicklung fördert Alcam das Wachstum und die Faszikulation von Axonen (DeBernardo und Chang, 1995) sowie die axonale Wegfindung (Weiner *et al.*, 2004). Dabei kann die wachstumsfördernde Wirkung auf die Axone auch über eine Interaktion mit dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül NgCAM (engl.: *neuron-glia cell adhesion molecule*) ausgeübt werden (DeBernardo und Chang, 1996). Auf die Rolle von Alcam während der Hämatopoese wird durch seine Expression in CD34-positiven Knochenmarkzellen sowie in den umgebenden Stromazellen hingewiesen (Cortés *et al.*, 1999). Zusätzlich korreliert die veränderte Alcam-Expression mit dem invasiven Wachstum diverser Melanome und dient als diagnostischer Marker für verschiedene Tumortypen (Degen *et al.*, 1998; van Kempen *et al.*, 2000). Neben den bereits erwähnten heterophilen Interaktionen mit CD6 und NgCAM, vermittelt Alcam ebenfalls homophile Adhäsionen. Hierbei erfolgt die laterale Oligomerisierung von Alcam-Molekülen durch die Membran-proximalen C-Typ Domänen, während die eigentliche Ligandenbindung durch die Membran-distale V1-Domäne vermittelt wird (van Kempen *et al.*, 2001; Abb. 4A).

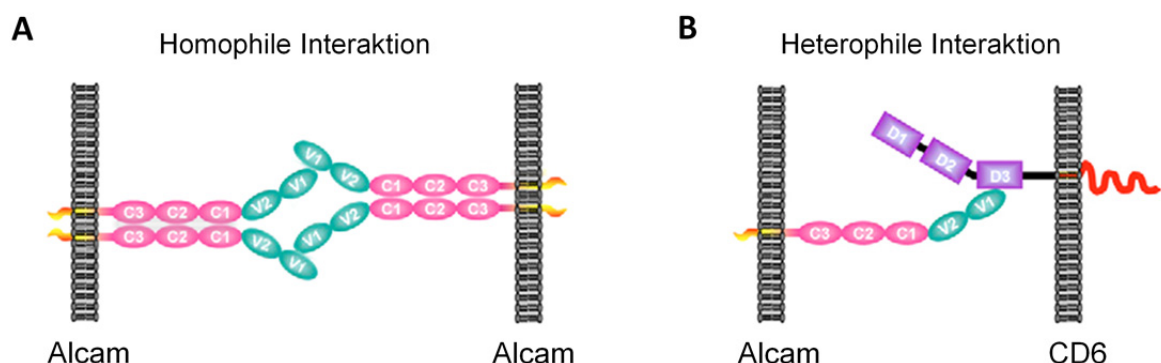


Abbildung 4. Alcam vermittelt homo- und heterophile Interaktionen.

(A) Alcam besitzt fünf extrazelluläre Immunglobulin- (Ig) Domänen, von denen die Membran-proximalen C-Typ Domänen in die laterale Oligomerisierung involviert sind und die Membran-distale V1 Ig-Domäne die eigentliche homophile Alcam-Alcam Interaktion vermittelt. (B) Die heterophile Interaktion mit CD6 wird durch die V1 Ig-Domäne des Alcam-Moleküls und die dritte Membran-proximale SRCR- (engl.: *scavenger-receptor cysteine-rich*) Domäne (D3) von CD6 vermittelt. Modifiziert nach Te Riet *et al.*, 2007.

Obwohl *Alcam* im embryonalen Herz exprimiert wird, liegen nur wenige Studien zu seiner Funktion während der Herzentwicklung vor. Im Zuge von Genexpressionsanalysen während der murinen Kardiogenese wurde *Alcam* als ein Oberflächenmarker für differenzierende Kardiomyozyten identifiziert. *Alcam* wird am Embryonaltag 8.25 (E8.25) im linearen Herzschauch und im Sinus Venosus exprimiert, ist aber nach der Ausbildung der vier Herzkammern am Tag E12.5 nicht mehr in der kardialen Region detektierbar (Hirata *et al.*, 2006). Im Jahr 2008 wurde zum ersten Mal die Rolle von *Alcam* während der Herzmorphogenese im Krallenfrosch *Xenopus laevis* analysiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass *Alcam* keinen Einfluss auf die Spezifizierung der kardialen Vorläuferzellen hat, jedoch für die Aufrechterhaltung der kardialen Genexpression im FHF sowie für die Initiierung der terminalen Differenzierung der Kardiomyozyten essentiell ist. Des Weiteren ist *Alcam* für die kardiale Morphogenese im *Xenopus* unerlässlich. Darüber hinaus wurde eine funktionelle Interaktion zwischen *Alcam* und dem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg während der Kardiogenese nachgewiesen (Gessert *et al.*, 2008).

1.5.2. *Alcam* im Zebrafärbling

Im Zebrafärbling wurden zwei *alcam*-Gene identifiziert, die aus einer Genduplikation hervorgegangen sind. Die zwei Paraloge, *alcama* und *alcamb*, zeigen distinkte und teilweise überlappende Expressionsmuster (Mann *et al.*, 2006). Während die Expression von *alcamb* mit der Gastrulation einsetzt, wird die *alcama*-Expression erst in den frühen Segmentierungsstadien initiiert. Beide Gene werden transient in Somiten und einigen Muskelzellen exprimiert sowie in weiten Teilen des zentralen und peripheren Nervensystems (Mann *et al.*, 2006). Morpholino-*Knockdown*-Analysen zeigten, dass *Alcama* für das Überleben der retinalen Ganglienzellen und die Differenzierung der restlichen Neuronen in der Retina benötigt wird. *Alcamb* spielt dagegen eine entscheidende Rolle bei der axonalen Wegfindung (Diekmann und Stuermer, 2009). Da eine *alcamb*-Expression im Herzen nicht nachweisbar ist, steht *Alcama* im Zentrum des Interesses der vorliegenden Arbeit.

Die Auswirkung der *alcama*-Defizienz auf die Herzentwicklung im Zebrafärbling wurde im Vorfeld der vorliegenden Arbeit von Dr. Benno Jungblut untersucht. In Zebrafärblingembryonen wird *Alcama* in allen Kardiomyozyten sowie in differenzierten

endokardialen Zellen des atrio-ventrikulären Kanals exprimiert (Beis *et al.*, 2005). Durch den Morpholino-vermittelten *Knockdown* von *alcama* konnte seine Herzkammer-spezifische Funktion bei der kardialen Morphogenese dokumentiert werden. *Alcama* reguliert morphologische Änderungen myokardialer Zellen während der Ausbildung beider Herzkammern. In dieser Entwicklungsphase nehmen die schuppenförmigen (engl.: *squamous*) Kardiomyozyten des Ventrikels eine kubische (engl.: *cuboidal*) Morphologie an, während im Atrium die Streckung der Kardiomyozyten erfolgt. Diese morphologischen Prozesse sind im Zebrafärbtingembryo von der *Alcama*-Aktivität abhängig (Untersuchungen von Dr. B. Jungblut; Abb. 5).

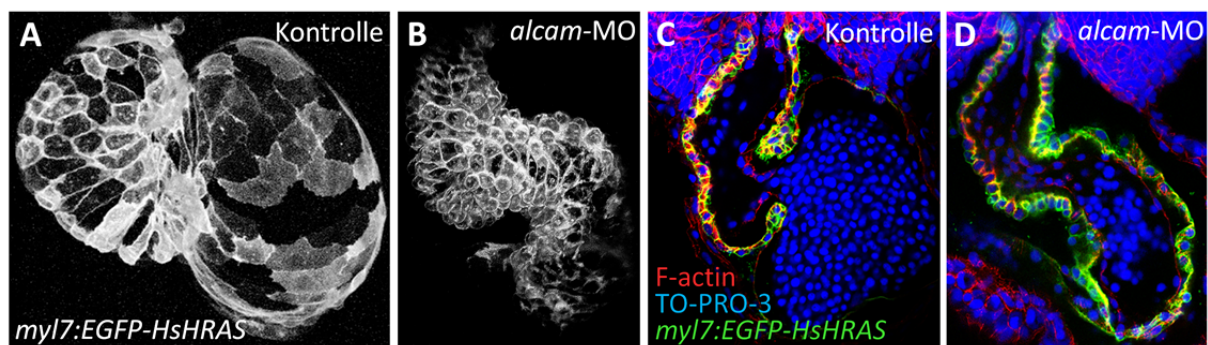


Abbildung 5. Alcama kontrolliert die Herzmorphogenese im Zebrafärbtingembryo.

(A-D) Konfokale Aufnahmen zeigen die Auswirkungen der *alcama*-Defizienz auf die Herzmorphogenese im Zebrafärbting. Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollembryonen (A) weisen *alcama*-Morphanten (B) eine gestörte Konfiguration und Morphologie der Kardiomyozyten bei 55 hpf auf. Im gleichen Stadium zeigen optische Schnitte durch das Zebrafärbtingherz kubische Kardiomyozyten im Ventrikel des Kontrollherzens (C), während die ventrikulären Kardiomyozyten *alcama*-defizienter Embryonen eine schuppenförmige Morphologie besitzen (D). Rot: mit Rhodamin-Phalloidin angefärbtes F-Aktin; Blau: mit TO-PRO-3 markierte Zellkerne; Grün (C, D) bzw. Weiß (A, B): EGFP wird unter der Kontrolle des *myl7*-Promotors in allen Kardiomyozyten exprimiert. Von Dr. B. Jungblut.

1.6. Aktinzytoskelett

Aktin stellt einen essentiellen Bestandteil des Zytoskeletts dar und spielt eine zentrale Rolle bei zahlreichen grundlegenden biologischen Prozessen, wie der Morphogenese und der Zellmotilität. Beim filamentösen Aktinpolymer (F-Aktin) unterscheidet man zwischen einem wachsenden Plus-Ende (engl.: *barbed end*) und einem Minus-Ende (engl.: *pointed end*), an dem das Filament verkürzt wird. Ein ATP-assoziiertes G-Aktin (globuläres Aktinmonomer) bindet bevorzugt an das Plus-Ende, während am Minus-Ende hauptsächlich die Hydrolyse von ATP-Aktin zu ADP-Aktin stattfindet, welches anschließend vom Filament dissoziiert. Nach der Depolymerisation wird das ADP an Aktinmonomeren gegen ATP ausgetauscht, wodurch

diese wieder am Plus-Ende eingefügt werden können. Die dynamische Reorganisation vom Aktinzytoskelett wird durch zahlreiche Aktin-bindende Proteine (ABPs) reguliert (siehe 1.7.). Frühere *in vitro*- und *in vivo*-Studien demonstrieren, dass die Dynamik des Aktinzytoskeletts auch in die transkriptionelle Regulation involviert ist (Miralles und Visa, 2006; Verdoni *et al.*, 2008). Dabei steuert das Aktin die SRF- (engl.: *serum response factor*) vermittelte Genexpression über den Rho/Aktin/MRTF-Signalweg. Der Transkriptionsfaktor SRF spielt eine Schlüsselrolle während der frühen Embryonalentwicklung und wird für den Aufbau des kontraktile Apparats von Muskelzellen benötigt (Landerholm *et al.*, 1999; Balza und Misra, 2006; Miano *et al.*, 2007). Die Funktion von SRF ist von seinem Co-Aktivator MRTF (engl.: *myocardin-related transcription factor*) abhängig, dessen Aktivität wiederum vom intrazellulären Level der Aktinmonomere kontrolliert wird (Settleman, 2003). Gleichzeitig kann SRF auch selbst auf die Aktindynamik zugreifen, indem dieser die Aktivität von Genen reguliert, die primär für Komponenten des Aktinzytoskeletts kodieren (Olson und Nordheim, 2010; Abb. 6).

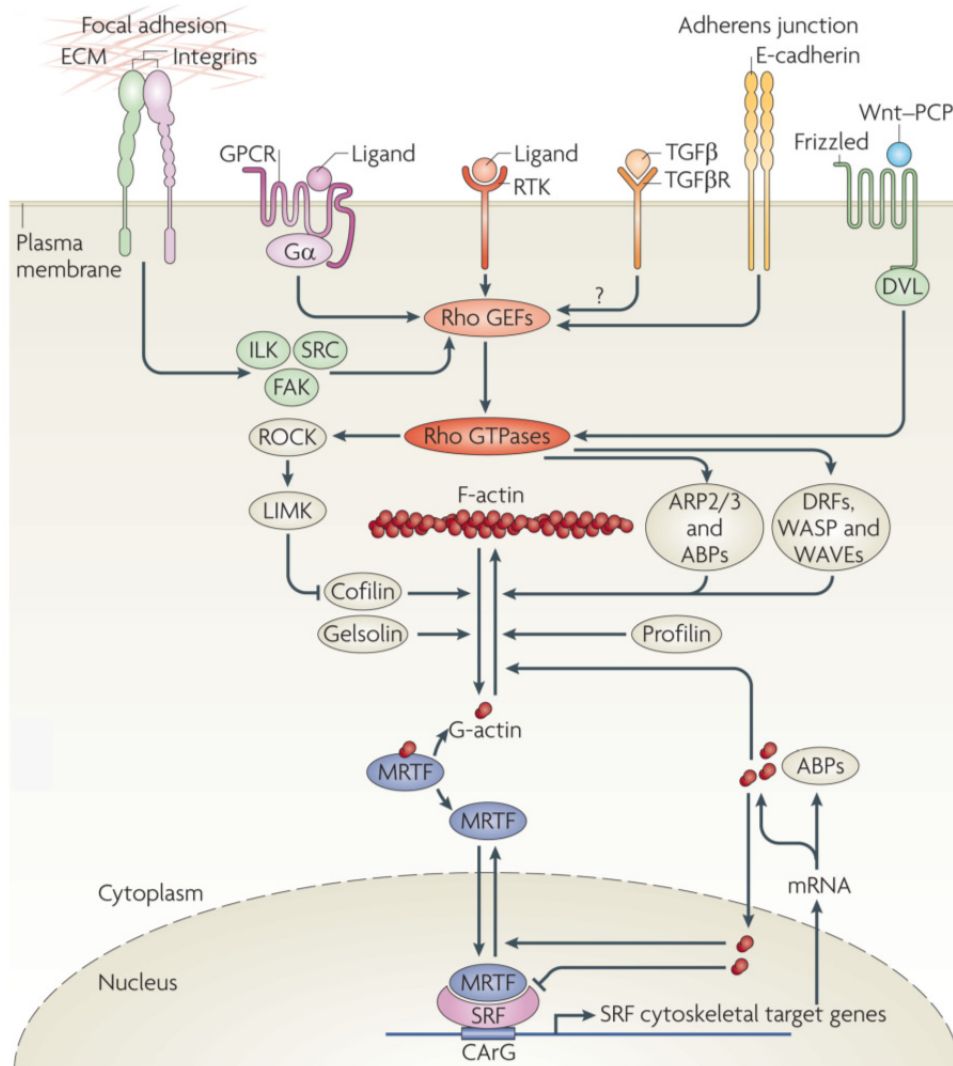


Abbildung 6. Der Rho/Aktin/MRTF-Signalweg kontrolliert die SRF-vermittelte Genexpression.

Die Aktindynamik wird durch die Aktivierung von sechs Rezeptorklassen beeinflusst: Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), Integrine als strukturelle Mediatoren von fokalen Adhäsionen, TGF- β -Rezeptoren, E-Cadherine an Adhärenz-Verbindungen (engl.: *adherens junctions*) und Frizzled, der den nicht-kanonischen Wnt-Signalweg vermittelt. Diese Rezeptoren modulieren die Aktivität der Rho-GTPasen durch GEFs (engl.: *guanine nucleotide exchange factors*). Die nachgeschalteten Effektoren von Rho-GTPasen kontrollieren die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Dazu zählen ROCKs (Rho-Kinasen), Formine (wie DRFs (engl.: *diaphanous-related formins*), WASP (wiskott-aldrich-syndrom-protein) und WAVEs (engl.: *WASP-family verprolin homologues*)) und der ARP2/3-Komplex (engl.: *actin-related protein 2/3*) sowie andere ABPs. Bei hoher Konzentration an G-Aktin liegt MRTF im Zytosol an G-Aktin gebunden vor. Durch die gesteigerte Aktin-Polymerisation wird MRTF freigesetzt, der daraufhin in den Nukleus transloziert und als SRF-Co-Aktivator agiert. Das nukleäre G-Aktin kann die MRTF-vermittelte Stimulation der SRF-abhängigen Transkription inhibieren und fördert den Export von MRTF aus dem Nukleus. Die Interaktion zwischen MRTF und SRF induziert die Expression von Aktin und zahlreichen ABPs, die wiederum die zytosolische Aktindynamik und somit die MRTF-Aktivität beeinflussen können. FAK (fokale Adhäsionskinase), ILK (engl.: *integrin-linked kinase*), LIMK (LIM-Kinase), DVL (Dishevelled). Entnommen aus Olson und Nordheim, 2010.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, kontrollieren verschiedene Rezeptortypen das Aktinzytoskelett durch die Modulation der Aktivität von Rho-GTPasen. Bei einer dieser Signalkaskaden handelt es sich um den planaren Zellpolaritäts-Signalweg (engl.: *planar cell polarity*, PCP), einem nicht-kanonischen Wnt-Signalweg. Dieser wurde ursprünglich in *Drosophila melanogaster* während der Etablierung der planaren Polarität identifiziert (Simons und Mlodzik, 2008). In Vertebraten reguliert PCP die konvergente Extension während der Gastrulation sowie die Polarisierung der Zilien während der Ausbildung der Links-Rechts-Achse (siehe 1.8.; Wallingford *et al.*, 2002; Hishimoto *et al.*, 2010). Das PCP-Proteinnetzwerk setzt sich aus mehreren Transmembranproteinen zusammen, wie Vangl1 und Vangl2 (*Drosophila*-Homolog: Van Gogh/ Strabismus), atypischen Cadherinen Celsr1, Celsr2 und Celsr3 (*Drosophila*-Homolog: Flamingo) sowie mehreren Frizzeld-Rezeptoren. Zu dem PCP-Proteinnetzwerk zählen zusätzlich die zyttoplasmatischen Schlüsselproteine Dishevelled (Dvl1, Dvl2, Dvl3) sowie Prickle (Pk1 und Pk2). *Downstream* von diesen Core-PCP-Proteinen agieren mehrere intrazelluläre Effektorproteine, einschließlich der kleinen GTPasen Rho und Rac, die die Reorganisation des Aktinzytoskeletts bewirken (Wallingford, 2012; Abb. 7).

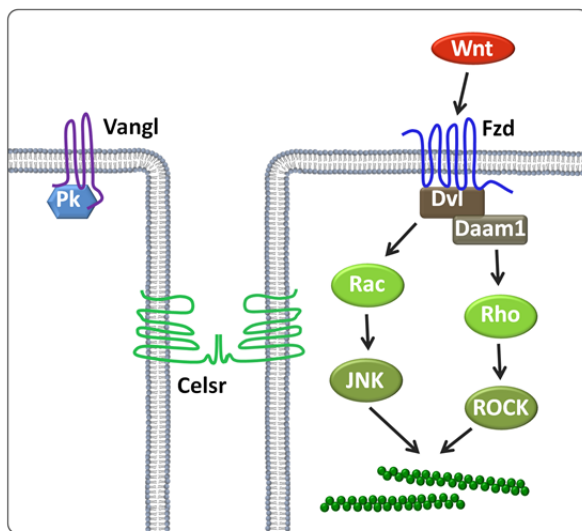


Abbildung 7. Die Planare-Zellpolaritäts-Signaltransduktionskaskade.

Die PCP-Signalkaskade wird durch die Bindung eines sekretierten Wnt-Liganden an entsprechenden Frizzeld-Rezeptor (Fzd) induziert, die zur Aktivierung von Dishevelled (Dvl) führt. In Assoziation mit Daam1 (engl.: *Dvl-associated activator of morphogenesis 1*) vermittelt Dvl über Rho die Aktivierung der Rho-Kinase (ROCK). Dvl bewirkt ebenfalls über Rac die Aktivierung von JNK (c-Jun N-terminale Kinase). Signale sowohl von ROCK als auch von JNK wirken auf das Aktinzytoskelett. Die planare Polarität wird zusätzlich von Celsr (engl.: *cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor*), Vangl (engl.: *van gogh-like*) und Prickle (Pk) vermittelt. Dabei weisen die PCP-Hauptkomponenten eine asymmetrische subzelluläre Lokalisation auf.

1.7. Cofilin

1.7.1. Die ADF/Cofilin-Familie

Cofilin ist ein Aktin-bindendes Protein und unter den Eukaryoten weit verbreitet. Homologe wurden in *Acanthamoeba*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, Hefe, Pflanzen und Vertebraten identifiziert (zusammengefasst in Moon und Drubin, 1995). Cofilin besitzt ein Molekulargewicht von etwa 19 kDa und wird durch das Aktin-Bindungsmodul, die sogenannte ADF-Homologie-Domäne, charakterisiert. Bei den Säugetieren wurden drei Cofilin-Isoformen identifiziert, die mit unterschiedlicher Effizienz an Aktin binden. Zu der ADF/Cofilin-Familie zählen Cofilin 1 (Nishida *et al.*, 1984), Cofilin 2 (Abe *et al.*, 1989) und ADF (Aktin-depolymerisierender Faktor, auch als Destrin bekannt; Moriyama *et al.*, 1990), die sich in ihrem räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster unterscheiden. Expressionsstudien in Mäusen zeigen, dass *Cofilin 1* während der embryonalen Entwicklung ubiquitär und auch später in den meisten adulten Geweben exprimiert wird (Vartiainen *et al.*, 2002). Allerdings ist *Cofilin 1* postnatal nicht mehr in der Skelettmuskulatur detektierbar. Die Expression von *Cofilin 2* wurde im sich entwickelnden Gehirn, in Herz- und Skelettmuskeln sowie im Testikel nachgewiesen. Im adulten Organismus ist Cofilin 2 die einzige in der Skelettmuskulatur exprimierte Isoform (Vartiainen *et al.*, 2002). ADF wird im Verlauf der Embryogenese nur mäßig exprimiert, postnatal dagegen wurde eine starke Expression im epithelialen und endothelialen Gewebe gezeigt (Gurniak *et al.*, 2005; Vartiainen *et al.*, 2002).

Die teilweise redundanten Funktionen der Cofilin-Isoformen während der Embryogenese konnten durch Funktionsverlustexperimente belegt werden. Der *Knockout* von *Cofilin 1* in der Maus hat embryonale Letalität zur Folge. Homozygote *Cofilin 1*-Mutanten zeigen eine gestörte Migration und Morphogenese der Neuralleistenzellen, die zu einer unvollständigen Schließung des Neuralrohrs führen (Gurniak *et al.*, 2005). Demgegenüber sind ADF-defiziente Mäuse lebensfähig und weisen keine embryonalen Defekte auf. Erhöhte Proliferation und Neovaskularisation der Cornea (Hornhaut), die schließlich zur Erblindung führen, sind hingegen die Hauptmerkmale adulter ADF-Mausmutanten (Ikeda *et al.*, 2003; Verdoni *et al.*, 2008). *Cofilin 2*-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls keine Auffälligkeiten in der embryonalen Entwicklung, sterben allerdings am achten Tag nach der Geburt. Während die sarkomerische Struktur der neonatalen Mutanten noch intakt ist, weist die Skelettmuskulatur am siebten Tag defekte Sarkomere auf (Agrawal *et al.*, 2012). Auch das humane Cofilin 2-Protein, das zu

99 % identisch mit der murinen Cofilin 2-Aminosäuresequenz ist, spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation des sarkomerischen Aktins von Skelettmuskeln. Eine rezessive *Cofilin 2*-Mutation wird bei Menschen mit kongenitaler Nemaline-Myopathie assoziiert (Agrawal *et al.*, 2007).

Im Zebrafärbling existieren ebenfalls drei Cofilin-Isoformen (<http://zfin.org>). Bei Cofilin 1 und Cofilin 1-*Like* handelt es sich um nicht-muskuläre Isoformen. Das muskelspezifische Protein wird auch im Zebrafärbling als Cofilin 2 bezeichnet. Mit Hilfe des Morpholino-vermittelten *Knockdowns* wurde die Funktion von Cofilin 1 während der Gastrulation im Zebrafärbling untersucht. In *cofilin 1*-Morphanten sind die konvergente Ausdehnung und die Zellmigration beeinträchtigt, sowie die koordinierte Bewegung der äußeren Hüllschicht und der Tiefenzellen. Dabei wird die unkoordinierte Migration durch die fehlende Interaktion zwischen den beiden Zellschichten hervorgerufen (Lin *et al.*, 2010). Zur Funktion von Cofilin 1-*Like* existieren noch keine Studien, während die Rolle von Cofilin 2 in der embryonalen Entwicklung erstmals in dieser Arbeit untersucht wurde.

1.7.2. Biochemische Charakterisierung der ADF/Cofilin-Familie

Mitglieder der ADF/Cofilin-Familie gelten als Schlüsselregulatoren der Aktindynamik, deren Effekte auf das Aktinzytoskelett vielfältig sind (Moon und Drubin, 1995). Durch die Bindung von ADF/Cofilin erhöht sich sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsrate von Aktinmonomeren (Carlier *et al.*, 1997), wodurch der Umbau der Aktinfilamente beschleunigt wird. ADF/Cofilin bindet sowohl an F-Aktin als auch G-Aktin und besitzt eine 100-fach höhere Affinität für ADP-assoziiertes G- und F-Aktin als für ATP- oder ADP-P_i-gekoppeltes Aktin (Carlier *et al.* 1997). Dabei interkaliert ADF/Cofilin zwischen zwei Aktinmoleküle und induziert an der Anheftungsstelle eine Veränderung in der Windungszahl der Aktin-Helix. Diese Konformationsänderung führt zu einer Destabilisierung des Aktinfilaments und hat eine 20- bis 30-fache Erhöhung der Dissoziationsrate zur Folge (Carlier *et al.*, 1997; Bamburg, 1999). Zusätzlich fördert ADF/Cofilin die Freilassung der Phosphatgruppe der benachbarten ADP-P_i-Aktin-Untereinheiten, wodurch die Dissoziation der Aktinmonomere am Minus-Ende der Aktinfilamente begünstigt wird (Blanchoin und Pollard, 1999).

Des Weiteren kann ADF/Cofilin eine spontane Polymerisation von Aktinmonomeren (*novo*-Aktinpolymerisation, Nukleation) bewirken. Hierbei wird die Aktin-Nukleation durch die Bindung des ADF/Cofilins an Aktinmonomere stimuliert, wodurch das Aktin-Dimer, das erste

Zwischenprodukt bei der spontanen Polymerisation, stabilisiert wird (Andrianantoandro und Pollard, 2006).

ADF/Cofilin besitzt zusätzlich die Fähigkeit zur Fragmentierung der Aktinfilamente (Pavlov *et al.*, 2007). Der hierbei zugrunde liegende Wirkungsmechanismus beruht auf zwei entgegengesetzten Effekten von ADF/Cofilin. Zum einen stabilisiert ADF/Cofilin die direkt gebundenen Aktin-Untereinheiten, zum anderen destabilisiert es aber die benachbarten ADF/Cofilin-freien Regionen durch eine induzierte Konformationsänderung (Dedova *et al.*, 2004). Die strukturelle Destabilisierung und somit der Bruch des Aktinfilaments erfolgt an der Stelle, an der die ADF/Cofilin-freie Region auf die ADF/Cofilin-assoziierten Aktin-Untereinheiten trifft (Bobkov *et al.*, 2002). Infolgedessen werden mehr freie Filamentenden generiert, die in Abhängigkeit von anderen ABPs entweder die Polymerisation oder Depolymerisation der Aktinfragmente fördern können (Andrianantoandro und Pollard, 2006).

Der Effekt von ADF/Cofilin auf die Aktindynamik ist von seiner lokalen Konzentration abhängig (Andrianantoandro und Pollard, 2006; Abb. 8). Die Abwesenheit oder sehr niedrige Konzentrationen von ADF/Cofilin führen zu stabilen Aktinfilamenten. Eine leicht erhöhte ADF/Cofilin-Konzentration begünstigt die Fragmentierung der Aktinfilamente. Ist die lokale ADF/Cofilin-Konzentration hingegen hoch, kommt es vor allem zur Dissoziation der Aktinmonomere am Minus-Ende der Aktinfilamente. Bei sehr hohen Konzentrationen des aktiven ADF/Cofilins wird vorwiegend eine erhöhte *de novo*-Aktinpolymerisation beobachtet (Andrianantoandro und Pollard, 2006).

Biochemische Charakterisierungen machten deutlich, dass alle drei Familienmitglieder Aktin-depolymerisierende und -fragmentierende Fähigkeiten besitzen, jedoch dafür unterschiedliche Effizienzen aufweisen (Vartiainen *et al.*, 2002). Im Vergleich zu Cofilin 1 und Cofilin 2 moduliert ADF die Aktindynamik am effizientesten, zeigt stärkere pH-Abhängigkeit für seine Aktin-depolymerisierende Aktivität (siehe 1.7.3.), hat aber ein geringeres Potenzial für die *de novo*-Nukleation (Vartiainen *et al.*, 2002; Yeoh *et al.*, 2002). Cofilin 2 weist eine 5- bis 10-fach höhere Affinität zu ATP-G-Aktin als ADF und Cofilin 1 auf, wodurch sich seine stärkere Aktin-polymerisierende Aktivität erklären lässt. Somit fördert Cofilin 2 eher die Polymerisation als die Depolymerisation von Aktinfilamenten (Vartiainen *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2005).

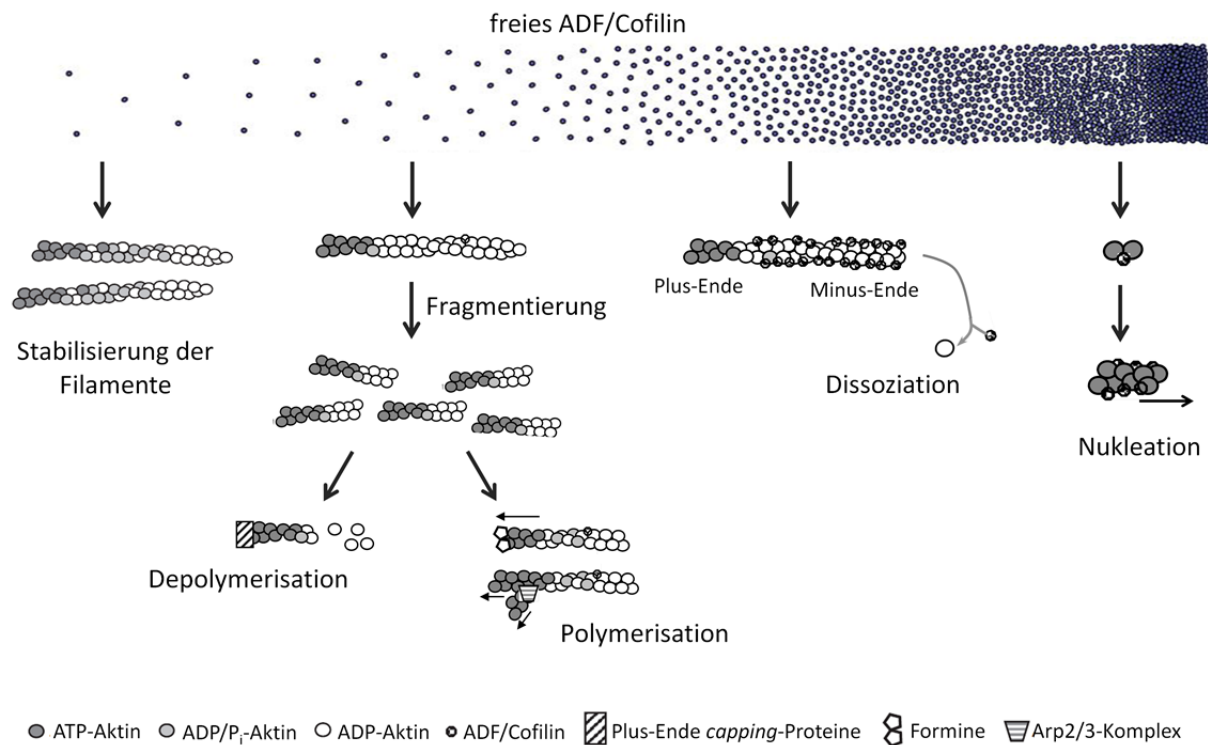


Abbildung 8. Konzentrationsabhängige Aktivität von ADF/Cofilin.

Liegt ADF/Cofilin in sehr niedrigen Konzentrationen vor, erfolgt keine Bindung an Aktinfilamente, woraus die Stabilisierung der Filamente resultiert. Bei etwas höheren ADF/Cofilin-Konzentrationen binden einzelne ADF/Cofilin-Moleküle an das F-Aktin und fördern dessen Fragmentierung. Einige Aktin-bindende *Capping*-Proteine wie Gelsolin lagern sich an die Plus-Enden der daraus resultierenden Aktinfragmente an, verhindern dadurch die Anheftung von weiteren Aktinmonomeren und begünstigen simultan die Depolymerisation an Minus-Enden. Andere *Capping*-Proteine wie Formine aktivieren die Polymerisation am Plus-Ende, während der Arp2/3-Komplex neue Verzweigungen von Aktinfragmenten generiert. Steigt die ADF/Cofilin-Konzentration weiter an, binden die ADF/Cofilin-Moleküle kooperativ an das F-Aktin und fördern die Dissoziation von Aktinmonomeren am Minus-Ende. Bei sehr hohen Konzentrationen bindet ADF/Cofilin an das G-Aktin und stimuliert die *de novo*-Aktinpolymerisation (Nukleation). Modifiziert nach Van Troys *et al.*, 2008 und Andrianantoandro und Pollard, 2006.

1.7.3. Regulationsmechanismen der ADF/Cofilin-Aktivität

Die Aktivität von ADF/Cofilin wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Einen wichtigen Regulationsmechanismus stellt die reversible Phosphorylierung des Serinrestes 3 dar, wodurch ADF/Cofilin inaktiviert wird. Durch diese posttranslationale Modifikation wird die Bindung des ADF/Cofilins sowohl an G- als auch F-Aktin sterisch gehemmt und somit seine Aktin-modellierende Funktion inhibiert (Bamburg und Wiggan, 2002). ADF/Cofilin wird dabei durch zwei Kinase-Familien phosphoryliert, die LIM-Kinasen und testikulären Kinasen (Scott und Olson, 2007; Toshima *et al.*, 2001). ADF/Cofilin kann durch die Dephosphorylierung reaktiviert werden. An diesem Aktivierungsprozess sind die Phosphatasen Slingshot und Chronophin beteiligt (Huang *et al.*, 2006). Die Aktivität der

Kinasen und Phosphatasen wird wiederum durch eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen reguliert, die in Abbildung 9 zusammengefasst sind.

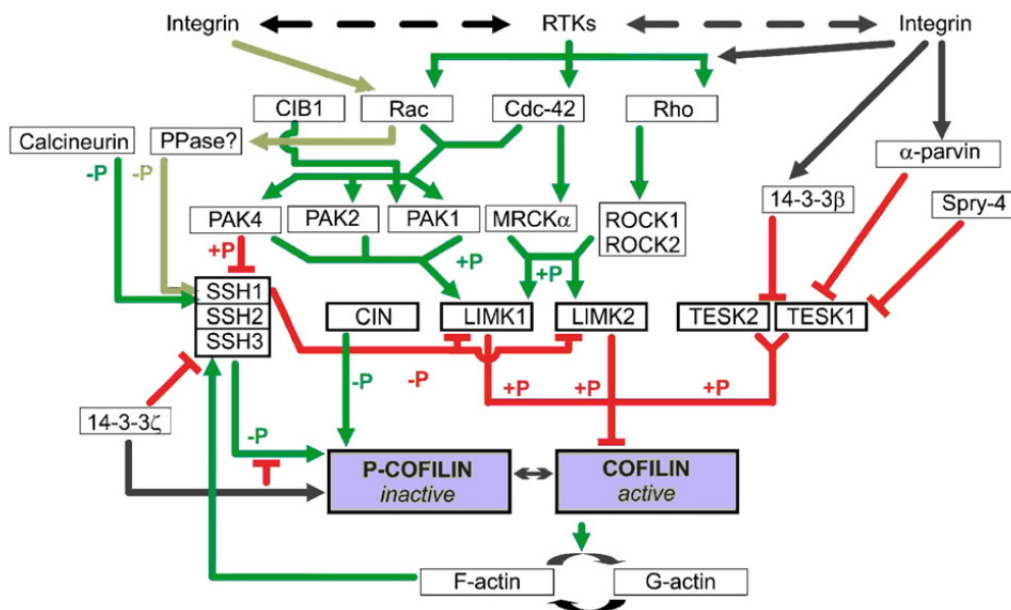


Abbildung 9. Regulation von ADF/Cofilin-Kinasen und -Phosphatasen.

Schematische Darstellung der Regulationswege, die zur Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ADF/Cofilin (in der Abb. zusammenfassend als Cofilin bezeichnet) führen. Zu den *downstream* Effektoren der kleinen GTPasen Rho, Rac und Cdc-42 zählen PAK (p21-aktivierte Kinase), MRCK- α (engl.: *myotonic dystrophy kinase-related cdc-42-binding kinase- α*) und ROCK (Rho-Kinase). Diese phosphorylieren und aktivieren somit LIMK1 und LIMK2 (LIM Kinase 1/2), die wiederum die Phosphorylierung und damit die Inhibierung von ADF/Cofilin (P-Cofilin) bewirken. Die GTPase-unabhängige Aktivierung von LIMK erfolgt über CIB1 (Calcium- und Integrin-bindendes Protein 1), das über PAK1 die Phosphorylierung von LIMK1 induziert. ADF/Cofilin wird ebenfalls von den TES-Kinasen (TESK) phosphoryliert, deren Aktivität durch die Integrin-initiierten Signalwege reguliert wird. Die Reaktivierung von ADF/Cofilin erfolgt durch die Dephosphorylierung über Chronophin (CIN) und die Slingshot-Phosphatasen (SSH). Zusätzlich führt die SSH-abhängige Dephosphorylierung von LIMK1/2 zu einer positiven Rückkopplung. Inhibiert wird Slingshot durch das 14-3-3 ζ -Protein sowie durch die PAK-vermittelte Phosphorylierung. Durch die Ca^{2+} -abhängige Dephosphorylierung über Calcineurin wird SSH wieder aktiviert. Zudem steigert die Bindung von SSH an Aktinfilamente seine Phosphatase-Aktivität. Rote Linien stellen inhibitorische Interaktionen dar, grüne Pfeile aktivierende Interaktionen und schwarze Pfeile Interaktionen mit noch unbekanntem Effekt. +P: Phosphorylierung, -P: Dephosphorylierung. Gestrichelte Pfeile zwischen Integrin und RTKs weisen auf eine Wechselwirkung zwischen diesen Rezeptorsystemen hin. Entnommen aus Van Troys *et al.*, 2008.

Zusätzlich wird die Aktivität von ADF/Cofilin durch seine Interaktion mit den Membranlipiden Polyphosphoinositide modifiziert. Durch die Wechselwirkung mit Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP_3) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) verliert ADF/Cofilin seine Aktin-bindende Kapazität, da es überlappende Bindungsstellen für diese Phospholipide und Aktin besitzt (Van Troys *et al.*, 2000). Die Stimulus-induzierte ADF/Cofilin-Aktivierung erfolgt durch die Phospholipase C, die die Hydrolyse von PIP_2 katalysiert (Mouneimne *et al.*, 2004; Zhan *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007).

Des Weiteren ist die zelluläre Aktivität von ADF/Cofilin pH-abhängig. Änderungen des intrazellulären pH-Wertes im physiologischen Bereich (6,8 bis 7,4) beeinflussen die Fragmentierungskapazität des aktiven ADF/Cofilins. Im leicht sauren Milieu kommt es überwiegend zur Stabilisierung des F-Aktins durch ADF/Cofilin, während höhere pH-Werte die Depolymerisation der Aktinfilamente fördern (Bamburg und Wiggan, 2002). Die Interaktion zwischen ADF/Cofilin und den Regulatoren des intrazellulären pH-Wertes, wie Na^+/H^+ -Austauscher und Na^+/K^+ -Pumpen konnte in verschiedenen Studien belegt werden (Lee *et al.*, 2001; Chiang *et al.*, 2008; Kaplan, 2005).

Darüber hinaus wird die Aktivität von ADF/Cofilin durch die synergistische oder kompetitive Interaktion mit anderen ABPs beeinflusst. So zeigt das Aktin-bindende Protein Aip1 (engl.: *actin-interacting protein 1*) *per se* nur einen geringen Effekt auf die Aktindynamik *in vitro*. Erst durch seine Bindung an ADF/Cofilin fördert Aip1 aktiv die ADF/Cofilin-vermittelte Fragmentierung (Iida und Yahara, 1999; Rodal *et al.*, 1999; Ono, 2007). Tropomyosin hat demgegenüber einen stabilisierenden Effekt auf die Aktinfilamente. Durch die kompetitive Bindung an Aktin blockiert Tropomyosin die Anheftung von ADF/Cofilin an Aktinfilamente (Bernstein und Bamburg, 1982; DesMarais *et al.*, 2002; Kuhn und Bamburg, 2008).

Die funktionelle Regulation von ADF/Cofilin ist komplex und essentiell für fundamentale, Aktin-vermittelte Prozesse, wie die Zytokinese (Abe *et al.*, 1996), Zellmigration, Endozytosis und die Entwicklung embryonalen Gewebes (Bamburg und Bray, 1987). So gehen Störungen des Expressionslevels, der Regulation oder der subzellulären Lokalisation von ADF/Cofilin mit pathologischen Veränderungen einher (Bamburg und Wiggan, 2002; Wang *et al.*, 2007).

1.8. Die Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie

Nach der Etablierung der anterior-posterioren und dorsal-ventralen Körperachsen wird die Links-Rechts-Achse in der Embryonalentwicklung determiniert. Obwohl Vertebraten äußerlich eine bilaterale Symmetrie aufweisen, sind die meisten inneren Organe asymmetrisch entlang der Links-Rechts-Achse orientiert. Die Links-Rechts-Asymmetrie ist ein konserviertes Merkmal aller Vertebraten (Levin, 2005; Raya und Izpisua Belmonte, 2006). Störungen bei der Spezifizierung der Links-Rechts-Achse haben in der Regel kongenitale Erkrankungen zur Folge, die des Öfteren mit kardialen Fehlbildungen assoziiert sind (Ramsdell, 2005; Sutherland und Ware, 2009). Die korrekte asymmetrische Konfiguration der

inneren Organe wird als *Situs Solitus* bezeichnet. Treten Anomalien zu Beginn der Links-Rechts-Achsenentwicklung auf, kann dies zu einer vollständigen Inversion der Organanlage führen (Bisgrove *et al.*, 2003). Der sogenannte *Situs Inversus Totalis* zieht keine erkennbaren physiologischen Defekte nach sich, da die Organe ihre normale Struktur und ihre relative Position zueinander beibehalten. Treten hingegen Änderungen später in der der Lateralität zugrunde liegenden Signalkaskade auf, ist gewöhnlich die Anordnung nur einiger Organe betroffen. Die randomisierte Platzierung der Organe entlang der Links-Rechts-Achse wird als Heterotaxie oder *Situs Ambiguus* bezeichnet und führt bei 90 % der Betroffenen zu kongenitalen Herzerkrankungen (Nugent *et al.*, 1994), wie Atrium-Septum-Defekt, Ventrikel-Septum-Defekt, Transposition der großen Arterien, *Double Outlet Right Ventricle* und Aortenbogen-Anomalien (zusammengefasst in Bowers *et al.*, 1996). Bei der Isomerie, einer Form der viszeralen Heterotaxie, liegen einzelne Organe symmetrisch vor, so dass diese zwei linke oder zwei rechte Hälften entwickeln. Dabei ist die Rechtsisomerie häufig mit einer Asplenie (fehlende Milz), die Linksisomerie mit einer Polysplenie (viele kleine Milze) assoziiert (Kosaki und Casey, 1998).

Die Entstehung der Lateralität lässt sich in drei zeitlich aufeinander folgende Phasen unterteilen. Die erste Phase zeichnet sich durch den Bruch der bilateralen Symmetrie aus, der in der zweiten Phase von der asymmetrischen Genexpression gefolgt wird und schließlich in der dritten Phase zur asymmetrischen Organmorphogenese führt.

1.8.1. Der Bruch der Symmetrie

1.8.1.1. Die Initiierung der Links-Rechts-Asymmetrie in der Maus

Mehrere Studien in der Maus deuten darauf hin, dass die ventralen Zellen des Primitivknotens (engl.: *node*), der am kranialen Ende des Primitivstreifens entsteht, an dem Bruch der Symmetrie maßgeblich beteiligt sind. Die Zellen des ventralen Primitivknotens sind mit Monozilien behaftet, die im Uhrzeigersinn (von der ventralen Seite betrachtet) rotieren und einen linksgerichteten Strom der extraembryonalen Flüssigkeit (engl.: *nodal flow*) erzeugen (Hirokawa *et al.*, 2006; Shiratori und Hamada, 2006). Dabei wird die Motilität der Zilien durch das axonemale Motorprotein Dynein sichergestellt. In verschiedenen Mausmutanten konnte eine Korrelation zwischen dem Verlust der Zilien-Struktur oder deren Motilität und dem Lateralitätsdefekt nachgewiesen werden. So finden sich in Mäusen nach gezielter Inaktivierung von zwei Motorproteinen der Kinesinfamilie, KIF3B und KIF3A, die für

den Aufbau der Monozilien von Bedeutung sind, keine Zilien im ventralen Primitivknoten. Infolgedessen bleibt der *Nodal Flow* aus und es kommt zu Störungen des Situs (Nonaka *et al.*, 1998; Marszalek *et al.*, 1999; Takeda *et al.*, 1999). Des Weiteren wird die *Inversus-Viscerum (iv)* Mutation, die auf einer veränderten Kette des Links-Rechts-Dyneins (Lrd) beruht, mit immotilen Knotenzilien und Randomisierung der Links-Rechts-Asymmetrie in Verbindung gebracht (Supp *et al.*, 1997). Das häufige Auftreten (etwa 50 %) von Lateralitätsdefekten bei Patienten mit immotilen Zilien (Kartagener-Syndrom) weist auf denselben Mechanismus beim Menschen hin (Brueckner, 2007).

1.8.1.2. Zwei Modelle zum Bruch der Symmetrie durch den *Nodal Flow*

Zur Klärung der Frage, wie der *Nodal Flow* die Links-Rechts-Achse determiniert, wurden zwei alternative Modelle vorgeschlagen, die sich jedoch gegenseitig nicht ausschließen (Abb. 10). Das „Morphogen-Modell“ postuliert, dass der Zilien-getriebene Fluss eine linksseitige Akkumulation von Morphogenen erzeugt, die wiederum eine asymmetrische Genexpression auslöst (Abb. 10A). Den direkten Hinweis für die Fähigkeit der Knotenzilien einen asymmetrischen Gradienten zu generieren lieferte Okada *et al.* (2005). Hierfür wurden fluoreszierende Partikel (vergleichbar mit einem 40 kDa-Protein) in den Primitivknoten eines Kaninchenembryos eingeschleust, die sich durch die Rotation der Zilien hauptsächlich auf der linken Körperseite verteilten. Zudem wurde gezeigt, dass FGF, Sonic hedgehog und Retinsäure an der Generierung des Morphogengradienten beteiligt sind (Tanaka *et al.*, 2005). Als zusätzliche Unterstützung des „Morphogen-Modells“ dient die Erkenntnis, dass die Monozilien der Maus, des Kaninchens und des Zebrafischs nach posterior geneigt sind und somit einen effektiven Schlag zur linken Seite produzieren (Cartwright *et al.*, 2004; Nonaka *et al.*, 2005; Kramer-Zucker *et al.*, 2005; Okada *et al.*, 2005).

Mit der Entdeckung der zwei Typen von Knotenzilien ist das „Zwei-Zilien-Modell“ entstanden, das von der physikalischen Stimulation durch den *Nodal Flow* ausgeht. Dabei wird der Flüssigkeitsstrom durch die zentralen, motilen Zilien generiert und von immotilen, mechanosensorischen Zilien in der Peripherie des ventralen Primitivknotens als Signal empfangen. Als eine Reaktion auf die Stimulation steigt die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen auf der linken Seite des Primitivknotens transient an, die daraufhin die asymmetrische Genexpression induziert (McGrath *et al.*, 2003; Tabin und Vogan, 2003; Abb. 10B). In diesen Prozess ist der Kationenkanal Polycystin-2 involviert, der in beiden Zilien-Typen exprimiert wird (McGrath *et al.*, 2003). *Polycystin-2*-defiziente Mäuse zeigen

demnach keinen Anstieg in der Ca^{2+} -Konzentration in der linken Peripherie des ventralen Primitivknotens (McGrath *et al.*, 2003) und weisen eine randomisierte Links-Rechts-Asymmetrie auf (Pennekamp *et al.*, 2002). Allerdings ist noch nicht geklärt, wie der Morphogengradient bzw. die ziliäre mechanische Reizung zur asymmetrischen Genexpression führt.

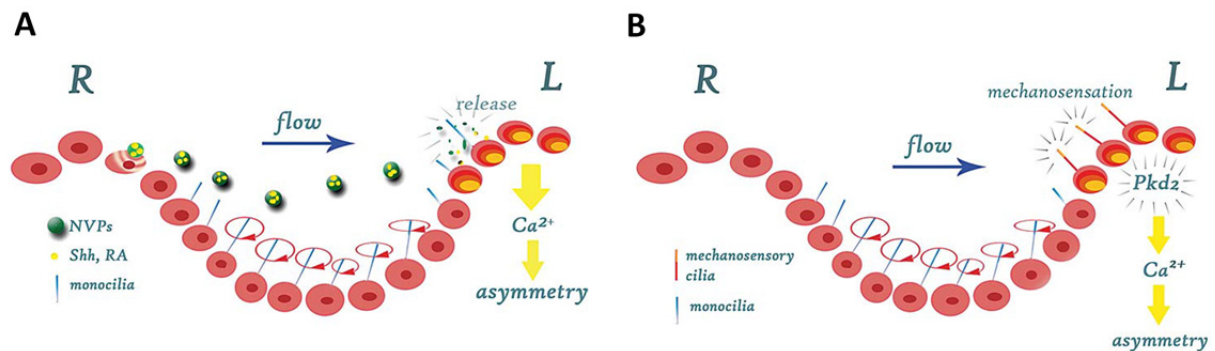


Abbildung 10. Zwei Modelle zur Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie durch den Nodal Flow.

(A) Das Morphogen-Modell. Morphogen-haltige Vesikel, sogenannte NVPs (engl.: *nodal vesicular parcels*), werden von den Zellen des ventralen Primitivknotens in Abhängigkeit von FGF8 abgesondert und durch den *Nodal Flow* zur linken Seite transportiert. Die akkumulierten NVPs setzen ihren Inhalt (Sonic hedgehog (Shh) und Retinsäure (RA)) frei, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration auf der linken Seite erhöht wird und die asymmetrische Genexpression induziert wird. (B) Das Zwei-Zilien-Modell. Die Monozilien im Zentrum des ventralen Primitivknotens sind motil und erzeugen den *Nodal Flow*, der von den mechanosensorischen Zilien in der Peripherie des Primitivknotens detektiert wird. Durch die physikalische Stimulation dieser Zilien wird der Calciumkanal Polycystin-2 (Pkd2) aktiviert. Das Ca^{2+} -Signal auf der linken Seite des Primitivknotens löst durch einen bislang unbekannten Mechanismus die asymmetrische Genexpression aus. Entnommen aus: Schlueter und Brand, 2007.

1.8.1.3. Das Kupffersche Vesikel ist das Lateralitätsorgan des Zebrafärblings

Die Existenz der Monozilien und die Expression von *Lrd* wurden in Äquivalenten des ventralen Primitivknotens vom Huhn, Frosch und Zebrafärbling dokumentiert (Essner *et al.*, 2002). Beim Huhn handelt es sich dabei um den Hensenschen Knoten, bei *Xenopus laevis* um die Archenterondachplatte (engl.: *gastrocoel roof plate*) und beim Zebrafärbling um das Kupffersche Vesikel (Essner *et al.*, 2002; Okada *et al.*, 2005; Lee und Anderson, 2008). Der Zilien-gesteuerte Flüssigkeitsfluss scheint somit ein unter Vertebraten konservierter Mechanismus zur Etablierung der Links-Rechts-Achse zu sein.

Das Kupffersche Vesikel (KV) ist ein Flüssigkeits-gefülltes Organ, das transient am posterioren Ende der Chorda dorsalis (engl.: *notochord*) in den frühen Segmentierungsstadien der Knochenfische (Teleostei) gebildet wird (Essner *et al.*, 2005). Die motilen Zilien des KV erzeugen einen konstanten, linksgerichteten Flüssigkeitsstrom, der für die asymmetrische Genexpression und die Etablierung der Lateralität unerlässlich ist

(Kramer-Zucker *et al.*, 2005). Das KV wird von DFCs (engl.: *dorsal forerunner cells*) generiert, die angrenzend zum Embryonalschild kurz vor der Initiation der Gastrulation entstehen (Cooper und D'Amico, 1996; Melby *et al.*, 1996) und von den Zellen der dorsalen Hüllschicht abstammen (Oteiza *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu den umgebenden Zellen durchlaufen DFCs im Verlauf der Epibolie keine Involution, sondern migrieren als ein zusammenhängender Zellcluster am Rand des Blastoderms durch die Anheftung an die äußere Hüllschicht zum vegetativen Pol. Während der späten Gastrulation durchläuft der DFC-Cluster eine progressive Kompaktierung, indem die DFCs eine flaschenförmige Morphologie annehmen. Am Ende der Gastrulation löst sich der DFC-Cluster von der äußeren Hüllschicht und generiert eine Rosettenstruktur, die in den nächsten zwei Stunden durch die Epithelisation, Ziliogenese, sowie Bildung und Expansion des Lumens zum KV differenziert. Die Entwicklung des KV ist im 6-Somitenstadium mit der Generierung der Monozilien in der apikalen Membran abgeschlossen (Oteiza *et al.*, 2008; Abb. 11).

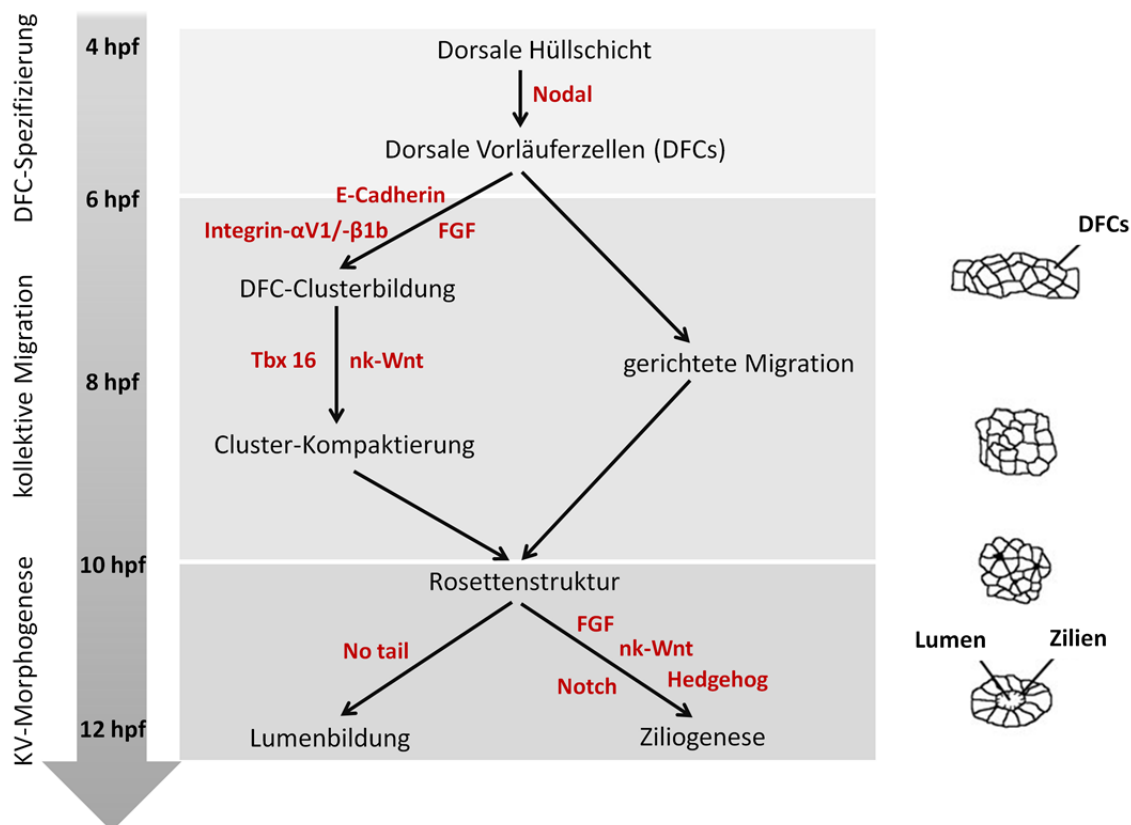


Abbildung 11. Die Bildung des Kupferschen Vesikels aus DFCs im Zebrafischembryo.

Das KV wird aus DFCs in drei Entwicklungsschritten gebildet. Im ersten Schritt spezifizieren die DFCs aus den Zellen der dorsalen Hüllschicht. In der zweiten Entwicklungsphase formen 20-30 DFCs einen Cluster, migrieren kollektiv zum vegetativen Pol und generieren im dritten Schritt die Rosettenstruktur, die sich durch die Lumenbildung und Ziliogenese zum KV entwickelt. Zahlreiche Signale (in rot) regulieren die spezifischen Schritte der KV-Morphogenese (siehe 1.8.1.4.). Nk-Wnt: nicht-kanonischer Wnt-Signalweg. Auf der rechten Seite sind die Prozesse vom DFC-Cluster bis zum reifen KV schematisch dargestellt. Modifiziert nach Matsui und Bessho, 2012.

1.8.1.4. Regulation der Entwicklung vom Kupfferschen Vesikel

Die strikte Regulation der DFC-Spezifizierung, Clusterbildung, kollektiven Migration, Cluster-Kompaktierung, Lumenbildung und Ziliogenese stellt die Voraussetzung für die Entwicklung eines funktionsfähigen KV dar. Zahlreiche Gene und Signalwege wurden identifiziert, die in die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie im Zebrafisch involviert sind. 20 bis 30 DFCs spezifizieren in der dorsalen Marginalzone des Blastoderms in Abhängigkeit vom Nodal-Signalweg (Oteiza *et al.*, 2008). Die Interaktion zwischen den DFCs wird durch verschiedene Zelladhäsionsmoleküle reguliert. Der DFC-Cluster wird durch die E-Cadherin-vermittelte Zelladhäsion zwischen benachbarten DFCs aufrechterhalten, die wiederum durch den FGF-Signalweg kontrolliert wird (Matsui *et al.*, 2011). Zusätzlich wird die Funktion von Integrin- α V1 und Integrin- β 1b für die zelluläre Interaktion der DFCs benötigt (Ablooglu *et al.*, 2010). Dies zeigt der Morpholino-basierte *Knockdown* von *E-Cadherin*, *Integrin- α V1* oder *Integrin- β 1b*, der in allen drei Fällen eine beeinträchtigte Adhäsion zwischen mehreren DFCs und einen Lateralitätsdefekt mit sich bringt (Matsui *et al.*, 2011; Ablooglu *et al.*, 2010). Darüber hinaus demonstriert eine weitere Studie die Bedeutung des nicht-kanonischen Wnt-Signalwegs (Abb. 7) bei der DFC-Clusterbildung und der KV-Morphogenese. Die Wnt11- und Prickle1a-vermittelte Wnt-Signalkaskade reguliert die Adhäsion und die Kompaktierung der DFCs sowie die zelluläre Organisation während der KV-Reifung (Oteiza *et al.*, 2010). Zudem sind zwei T-Box- (Tbx) Transkriptionsfaktoren in die Bildung eines funktionsfähigen KV involviert. Während Tbx16 die DFC-Kompaktierung steuert, wird Ntl (*No tail*, Homolog zum Mausgen *Brachyury*) für die Lumenbildung benötigt (Amack *et al.*, 2007). Weiterhin wird in mehreren Studien dokumentiert, dass die Kontrolle der Ziliogenese durch die FGF-, Hedgehog-, Notch- und nicht-kanonische Wnt-Signalwege erfolgt (Abb. 11). Störung eines dieser Signalwege hat die Randomisierung der Links-Rechts-Asymmetrie zur Folge, die aus der eingeschränkten Zilienfunktion und dem gestörten Flüssigkeitsfluss resultiert (Neugebauer *et al.*, 2009; Stubbs *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2010; Oishi *et al.*, 2006).

Ein weiterer Regulator der KV-Morphogenese ist der Transkriptionsfaktor Sox17 (Aamar und Dawid, 2010), der als ein Marker für endodermale Vorläuferzellen gilt und zusätzlich in DFCs und KV exprimiert wird (Alexander und Stainier, 1999; Oteiza *et al.*, 2008). Sox17 wird in den meisten Lateralitätsstudien, wie auch in der vorliegenden Arbeit, zur Visualisierung der DFC-Migration und KV-Bildung eingesetzt.

1.8.2. Die Etablierung der asymmetrischen Genexpression

Für die Etablierung der asymmetrischen Genexpression in der zweiten Phase der Lateralitätsdeterminierung wird in allen Vertebraten das sekretierte Morphogen Nodal aus der Familie der transformierenden Wachstumsfaktoren- β (engl.: *transforming growth factor- β* , TGF- β) benötigt (Schier, 2009). Sein Zebrafisch-Homolog *Southpaw* (Spaw) wird zunächst im 4-Somitenstadium bilateral im KV exprimiert. Im 10-Somitenstadium ist die *spaw*-Expression schließlich auf das linke LPM limitiert (Long *et al.*, 2003). Bis heute ist jedoch noch nicht vollständig verstanden, wie zunächst bilateral verteilte Spaw-Moleküle auf das linke LPM begrenzt werden. In den letzten Jahren gewonnene Erkenntnisse zeigen hierfür mögliche Mechanismen auf. Wie bereits im Mausembryo beobachtet (McGrath *et al.*, 2003), fördert der linksgerichtete Flüssigkeitsstrom auch im Zebrafisch den Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in den Zellen, die auf der linken Seite des KV lokalisiert sind (Jurynek *et al.*, 2008; Sarmah *et al.*, 2005). Der erhöhte Ca^{2+} -Level aktiviert die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK-II), die wiederum die Freisetzung von weiteren Calciumionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum sowie den extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom fördert (Francescato *et al.*, 2010). Diese Signalamplifikation stimuliert womöglich die lokale Prozessierung und/oder die Sekretion von Spaw auf der linken Seite des KV (Matsui und Bessho, 2012). Als ein negativer Spaw-Regulator trägt Charon, ein Mitglied der Cerberus/Dan-Familie, zusätzlich zur Generierung der asymmetrischen *spaw*-Expression bei (Hashimoto *et al.*, 2004). Bedingt durch seine rechtsseitige Expression im 10-Somitenstadium (Lopes *et al.*, 2010) inhibiert Charon die Spaw-Aktivität im rechten LPM (Hashimoto *et al.*, 2004).

Ist die *spaw*-Expression am posterioren Ende des linken LPM im 10-Somitenstadium initiiert, breitet sich diese durch den autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus in anteriore Richtung aus (Long *et al.*, 2003; Wang und Yost, 2008). Analog zu Nodal induziert Spaw dabei seine eigene Expression. Diese positive Rückkopplung ist für die Etablierung der asymmetrischen *spaw*-Expression von entscheidender Bedeutung (Schier, 2009; Shiratori und Hamada, 2006). Zusätzlich induziert Spaw die Expression von weiteren Mitgliedern der TGF- β Familie, *Lefty-1* und *Lefty-2*. Beide agieren als Antagonisten von Spaw und beschränken durch diese negative Rückkopplung dessen Expression auf ein spezifisches Areal im linken LPM. *Lefty-1* wird in der Chorda dorsalis exprimiert und wirkt als molekulare Mittellinie-Barriere, indem es die Expansion von Spaw zur rechten Seite blockiert. Der

Verlust der Lefty1-Funktion im Zebrafärbling resultiert in einer bilateralen *spaw*-Expression und Störung des Situs (Smith *et al.*, 2011). Diese Erkenntnisse stimmen mit den Mausdaten überein, die Lefty1 als eine Hauptkomponente der Mittellinie-Barriere beschreiben (Meno *et al.*, 1998). Im Expressionsmuster von *Lefty-2* bestehen zwischen Maus und Zebrafärbling dagegen Unterschiede. Während *Lefty-2* durchgehend im linken LPM des Mausembryos exprimiert wird (Meno *et al.*, 1997), ist die *lefty-2*-Expression im Zebrafärblingembryo auf das linke Herzfeld beschränkt (Thisse und Thisse, 1999). Somit agiert Lefty-2 im Zebrafärbling als anteriore Barriere, um die Ausbreitung von Spaw zur anterioren Seite zu begrenzen (Lenhart *et al.*, 2011). Beide durch Lefty-vermittelten Barrieren sind unter Vertebraten konserviert, ihre Lokalisation wurde jedoch in jeder Vertebraten-Spezies spezifisch modifiziert (Lenhart *et al.*, 2011). Auch die Etablierung der asymmetrischen Genexpression durch Selbstverstärkung und laterale Inhibition scheint ein allgemeiner Mechanismus der Vertebraten zu sein (Nakamura *et al.*, 2006; Wang und Yost, 2008; Abb. 12).

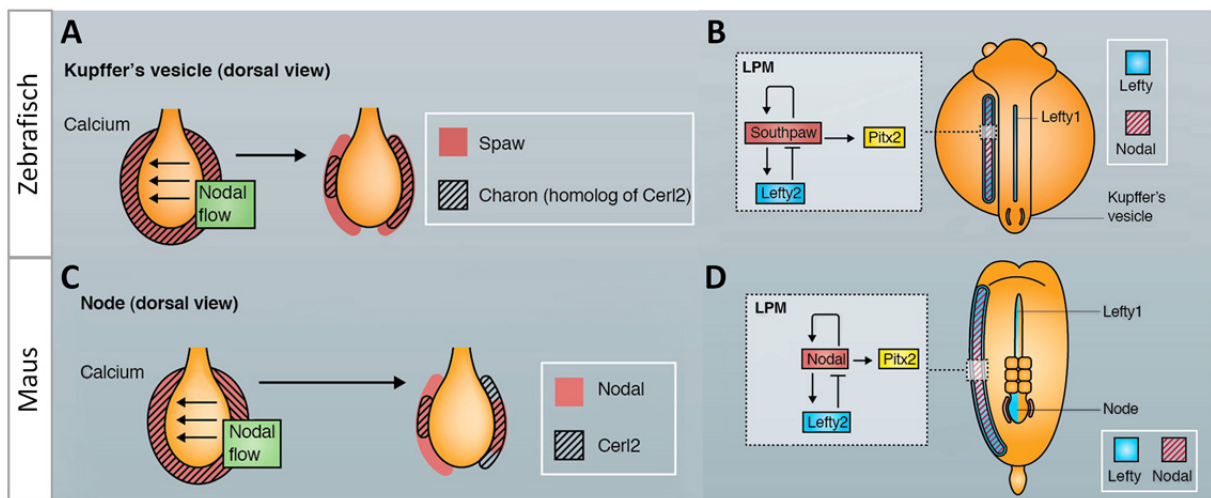


Abbildung 12. Etablierung der asymmetrischen Genexpression im Maus- und Zebrafärblingembryo.

(A, C) Als Konsequenz des gerichteten Flüssigkeitsstroms kommt es zu einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration auf der linken Seite des KV im Zebrafärblingembryo (A) bzw. Primitivknotens im Mausembryo (C). Diese verstärkt durch einen noch ungeklärten Mechanismus die Expression von *Nodal/southpaw (spaw)* auf der linken Seite und von seinen Antagonisten *charon/Cerberus like 2 (Cerl2)* hauptsächlich auf der rechten Seite. (B, D) Die *Nodal/spaw*-Expression wird durch die Selbstaktivierung im linken LPM induziert und amplifiziert. Zusätzlich aktiviert Nodal/Spaw die Expression von *Lefty1* und *Lefty2*, die als Nodal-Inhibitoren agieren und eine höhere Diffusionsgeschwindigkeit als Nodal/Spaw aufweisen. Die asymmetrische Nodal/Spaw-Aktivität im linken LPM induziert die Expression des Transkriptionsfaktors Pitx2, der die asymmetrische Morphogenese mehrerer Organe in beiden Vertebratenspezies steuert (B, D; siehe 1.8.3.). Modifiziert nach Nakamura und Hamada, 2012.

1.8.3. Die asymmetrische Organmorphogenese

In der letzten Phase der Lateralitätsdeterminierung wird die asymmetrische Organmorphogenese durch die linksseitige Aktivierung des Spaw-Signalweges gesteuert. So wird die Rotation des Zebrafischherzens direkt durch die asymmetrische Expression von *bmp4*, *lefty1*, *lefty2* und *pitx2* beeinflusst (Baker *et al.*, 2008; de Campos-Baptista *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2008). Der Homöobox-Transkriptionsfaktor Pitx2 spielt eine zentrale Rolle bei der asymmetrischen Organentwicklung in allen Vertebraten. Dieser wird linksseitig sowohl im LPM als auch in sich entwickelndem Herzen, Magen und Darm exprimiert (Ryan *et al.*, 1998; Capdevila *et al.*, 2000). Es ist jedoch noch weitgehend unbekannt, wie die Links-Rechts-Informationen aus dem LPM zu den Organanlagen übermittelt werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die genetischen Mechanismen, die die Links-Rechts-Achsenentwicklung steuern, evolutionär unter den Vertebraten konserviert sind. So zieht der Verlust oder eine Manipulation der linksseitigen *spaw* bzw. *Nodal*-Expression stets Lateralitätsdefekte nach sich (Lowe *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2003; Burdine und Schier, 2000; Schier, 2003).

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Die Herzmorphogenese beruht unter anderem auf einer strikten Regulation der adhäsiven Eigenschaften von Kardiomyozyten. Obwohl das Zelladhäsionsmolekül Alcam im embryonalen Vertebratenherz exprimiert wird, ist nur wenig über seine Funktion in der kardialen Entwicklung bekannt. In Vorarbeiten von Dr. Benno Jungblut wurde gezeigt, dass das Zebrafisch-Homolog Alcama für die Reifung der Kardiomyozyten im Zebrafischembryo unerlässlich ist. Der zelluläre und molekulare Mechanismus, der der Alcama-vermittelten Zelladhäsion und seiner Regulation während der kardialen Morphogenese zugrunde liegt, bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, neue Interaktionspartner von Alcama zu identifizieren und zu charakterisieren. Ein in dieser Arbeit neu identifizierter Interaktionspartner von Alcama ist das Aktin-bindende Protein Cofilin 2. Im Gegensatz zu der ubiquitären Isoform Cofilin 1 existieren zu der muskelspezifischen Form Cofilin 2 nur wenige Studien. Daher sollte im Hauptteil dieser Arbeit die Funktion von Cofilin 2 während der embryonalen Entwicklung des Modellorganismus Zebrafisch ermittelt werden. Mit Hilfe

von *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen sollte zunächst das räumliche und zeitliche Expressionsmuster von *cofilin 2* (*cfl2*) untersucht werden. Der Morpholino-vermittelte *Knockdown* von *cfl2* sollte Aufschluss über seine Funktion während der Kardiogenese und der Determinierung der Links-Rechts-Achse geben. Der aus der *cfl2*-Inaktivierung resultierende Phänotyp sollte konfokal-mikroskopisch untersucht werden. Dabei sollte unter anderem geklärt werden, ob und welchen Einfluss die Defizienz von *cfl2* auf die Alcamafunktion in Kardiomyozyten hat. Darüber hinaus sollten weitere molekular- und zellbiologische Methoden angewendet werden, um die Entstehung der kardialen und Lateralitätsdefekte zu verstehen.

2. ERGEBNISSE

2.1. Cofilin 2 interagiert mit Alcama und reguliert die Herzmorphogenese im Zebrafärbling

2.1.1. Cofilin 2 interagiert mit Alcama

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner von Alcama (engl.: *activated leukocyte cell adhesion molecule a*) wurde eine Immunpräzipitation mit dem Zelllysate aus 50 hpf alten Zebrafärblingembryonen durchgeführt (siehe 5.5.4.). Der Alcama-Proteinkomplex wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers zn-8 präzipitiert, der spezifisch das Alcama-Protein des Zebrafärblings erkennt. Als Negativkontrolle diente der Proteinextrakt aus *alcama*-Morphanten, der eine Differenzierung zwischen spezifischen und unspezifischen Interaktionen ermöglichte. Die präzipitierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und einer enzymatischen Spaltung (In-Gel-Verdau; siehe 5.5.6.) zur Reduktion der Komplexität unterzogen. Nach der Extraktion der generierten Peptide wurden diese dem Massenspektrometer zugeführt. Aus der massenspektrometrischen Analyse gewonnene Messdaten wurde eine Ratio berechnet, die sich aus den Werten der *alcama*-Morphanten und denen der unbehandelten Embryonen ergab. Ein kleiner Ratio-Wert deutete hierbei auf eine spezifische Interaktion hin. Basierend auf dieser Auswertung wurden einige Kandidaten für eine Interaktion mit Alcama identifiziert (Abb. 13A). Für weitere Interaktionsstudien wurde das Aktin-bindende Protein Cofilin 2 selektiert, da dieser Kandidat ein potentielles Bindeglied zwischen dem Aktinzytoskelett und Alcama darstellt. Zur Verifizierung der Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 wurden HEK 293T-Zellen transient mit Alcama und FLAG-HA-gekoppeltem Cofilin 2 des Zebrafärblings co-transfiziert. Als Negativkontrolle erfolgte die Transfektion mit dem Alcama- bzw. Cofilin 2-haltigen Plasmid zusammen mit dem leeren pcDNA3-Flag-HA- bzw. pCMV-SPORT6.1-Vektor (siehe 5.3.1.). Zuvor wurde die endogene *ALCAM*-Expression dieser Zelllinie durch eine RT-PCR-Analyse sichergestellt, wodurch auch die Präsenz von Alcam-Interaktionspartnern wahrscheinlich wird. Die Co-Immunpräzipitation wurde mit dem Zelllysate aus den transfizierten HEK 293T-Zellen und dem an Protein-A-Sepharose-gekoppelten Antikörper zn-8 ausgeführt (siehe 5.5.5.). Der präzipitierte Proteinkomplex wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (siehe 5.5.2.). Das Fusionsprotein Cofilin 2-FLAG-HA wurde mit einem anti-HA-Antikörper detektiert. Cofilin 2 co-präzipitierte mit Alcama, war jedoch nicht in den Kontrolltransfektionen detektierbar, wodurch die Spezifität der Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 demonstriert wird (Abb. 13B).

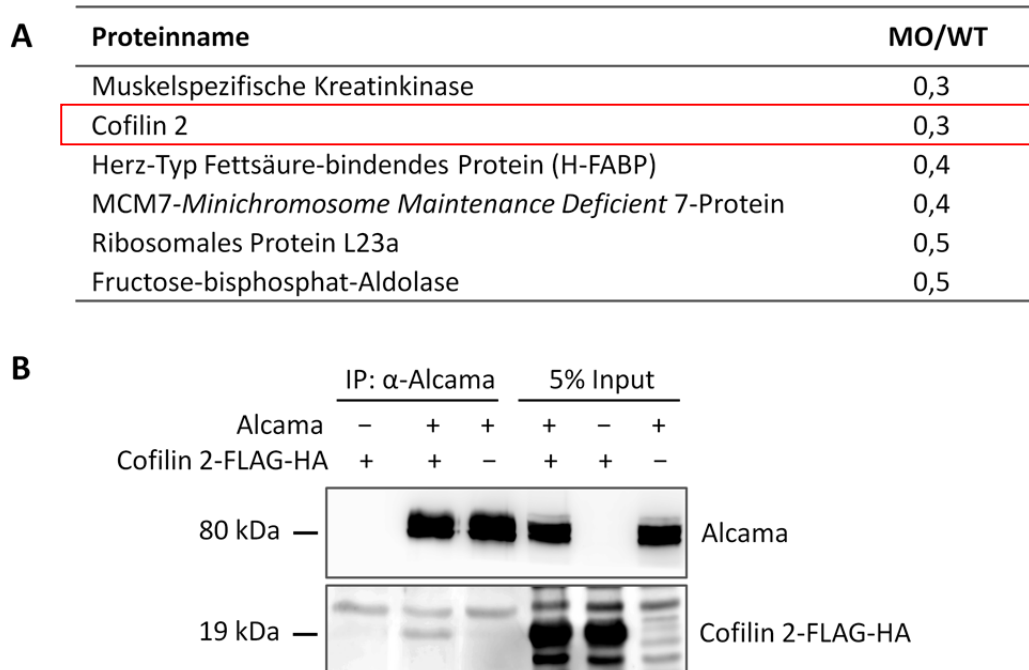


Abbildung 13. Cofilin 2 interagiert mit Alcama.

(A) Potentielle Interaktionspartner von Alcama, die aus einer massenspektrometrischen Messung hervorgingen. Die kleinen Ratio-Werte MO/WT deuten darauf hin, dass die entsprechenden Proteine in großer Anzahl in Wildtyp- (WT) Embryonen detektiert wurden und in *alcama*-Morphanten (MO) stark reduziert waren. Cofilin 2 (rot markiert) wurde für weitere Untersuchungen selektiert. (B) Die Western Blot-Analyse nach einer Co-Immunpräzipitation (IP) zeigte, dass Cofilin 2-FLAG-HA mit Alcama co-präzipitierte, jedoch nicht in Abwesenheit von Alcama. Die Intensität der Banden im 5 %-igen Input korreliert mit den eingesetzten Proteinmengen. Hier ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Wiederholungsexperimenten dargestellt.

2.1.2. Zeitlich-räumliches Expressionsmuster von *cofilin 2* im Zebrafärblingembryo

In den folgenden Experimenten wurde die Funktion von Cofilin 2 während der embryonalen Entwicklung des Zebrafärblings untersucht. Zunächst wurde das zeitliche und räumliche Expressionsmuster von *cofilin 2* (*cfl2*) mittels *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen analysiert (siehe 5.4.6.). Entgegen bisheriger Annahmen, die von der Initiation der *cfl2*-Expression ab der Segmentierungsperiode ausgingen (Thisse *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2010), wurden *cfl2*-Transkripte bereits im Einzellstadium detektiert (Abb. 14A). Die *cfl2*-Transkription in den frühen Furchungsstadien wurde mit Hilfe einer RT-PCR-Analyse verifiziert (Abb. 15A). Im Zebrafärbling setzt die zygotische Gentranskription erst nach der zehnten Zellteilung (ca. 3 hpf) ein. Daher handelt es sich in den frühen Stadien (Abb. 14A, B) um maternale *cfl2*-Expression (Kimmel *et al.*, 1995). Während der Furchungsteilungen und der Gastrulation wurde ubiquitäre *cfl2*-Expression beobachtet (Abb. 14A-D), die während

der Segmentierung gewebespezifischer wurde (Abb. 14E-G). Im 15-Somitenstadium war eine deutliche Abgrenzung der Färbung im Kopfbereich von der des restlichen Körpers zu erkennen (Abb. 14F). Bei 20 hpf wurden *cfl2*-Transkripte in allen Gehirnregionen detektiert (Abb. 14G). Zusätzlich wurde die *cfl2*-Expression in den sich entwickelnden Myotomen (Abb. 14J), in den Augenlinsen (Pfeilspitze in Abb. 14K) und im Herzen (Pfeil in Abb. 14H) nachgewiesen. Für die Detektion der *cfl2*-mRNA in den Linsen wurde die Färbereaktion vorzeitig abgestoppt. Dies sollte verhindern, dass die Linsensignale von der Färbung der Gehirnstrukturen überlagert werden. Nach dem Schlüpfen wies die Larve bei 72 hpf dasselbe gewebespezifische *cfl2*-Expressionsmuster auf (Abb. 14I) wie bereits Stunden zuvor in der Entwicklung beobachtet. Zur Verifizierung der Sondenspezifität wurden die *in situ*-Kontrollhybridisierungen mit einer *Sense*-Sonde durchgeführt. Die Verwendung dieser Negativkontrolle ergab keine Hybridisierungssignale (hier nicht gezeigt) und beweist somit die Spezifität der *cfl2*-*Antisense*-Sonde.

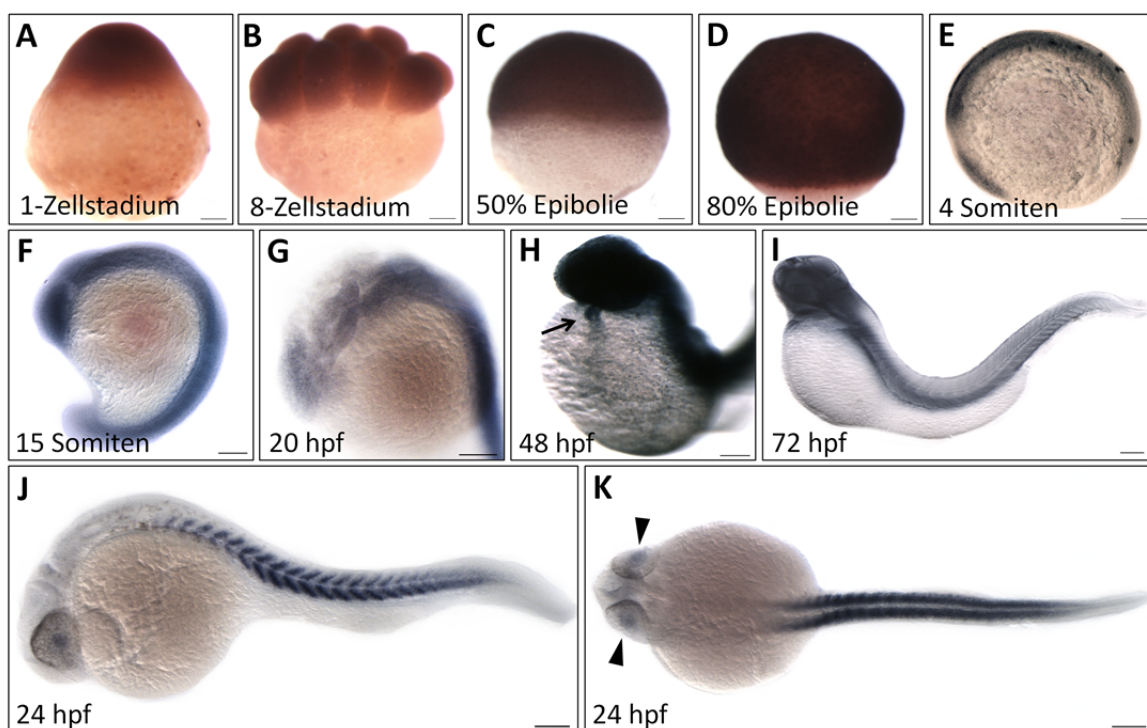


Abbildung 14. Expressionsmuster von *cfl2* im Zebrafärbingembryo.

(A-K) Analyse des räumlichen *cfl2*-Expressionsmusters über die verschiedenen Entwicklungsstadien mittels *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen. *Cfl2* wird maternal exprimiert (A, B). Die zunächst ubiquitäre *cfl2*-Expression (A-D) wird mit der Segmentierungsphase gewebespezifisch (E-G). *Cfl2*-Transkripte wurden im zentralen Nervensystem (F, G), im Herzen (Pfeil in H), in den Somiten (I, J) und in den Augenlinsen (Pfeilspitzen in K) detektiert. (A-D) der animale Pol ist nach oben orientiert; (E, F, I, J) Lateralansicht, der Kopf ist nach links orientiert; (G) dorsal-laterale Ansicht; (H) ventral-laterale Ansicht; (K) dorsale Ansicht. Maßstab: 0,1 mm.

In den bisherigen Expressionsstudien der muskelspezifischen Cofilin-Isoform in der embryonalen Mausentwicklung konnte die *cfl2*-Expression erstmals am Embryonaltag E9.5 nachgewiesen werden (Neidhardt *et al.*, 2000, Vertiainen *et al.*, 2002), wobei sich die meisten *cfl2*-Analysen auf die späte embryonale und frühe postnatale Entwicklung konzentrierten (Mohri *et al.*, 2000; Ono *et al.*, 1994). Um zu klären, ob die *cfl2*-Funktion auch schon im frühen Mausembryo benötigt wird, wurden RT-PCR-Analysen mit cDNAs aus verschiedenen embryonalen Stadien durchgeführt. Hierbei konnten *cfl2*-Transkripte eindeutig an den Embryonaltagen E6.5, E7.5, E8.5 und E9.5 detektiert werden (Abb. 15B). Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), ein Enzym des Purinstoffwechsels, fungierte dabei als interner Standard.

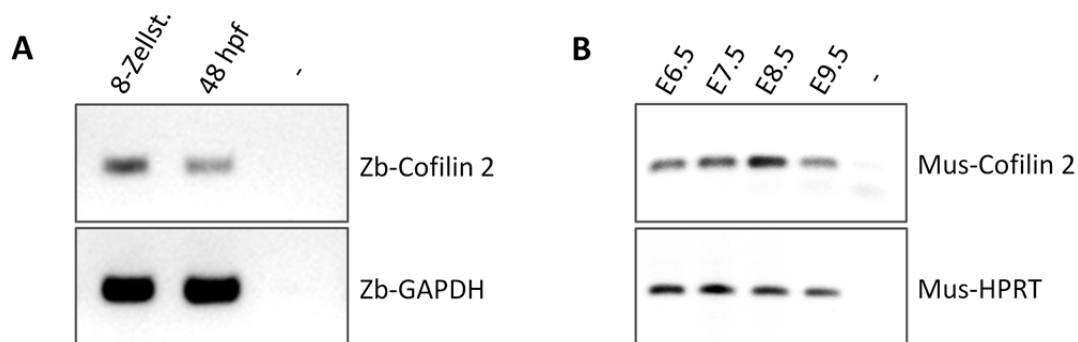


Abbildung 15. Nachweis der *cfl2*-Expression im frühen Zebrafärbärling- und Mausembryo.

(A) Mittels einer RT-PCR-Analyse erfolgte der Nachweis der *cfl2*-Transkripte im 8-Zellstadium sowie bei 48 hpf im Zebrafärbärling (Zb). In der Negativkontrolle (–, PCR-Ansatz ohne cDNA) wurde kein Amplifikationsprodukt detektiert. Die Intensität der GAPDH- (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) Banden korreliert mit den eingesetzten cDNA-Mengen. (B) Die RT-PCR-Analyse wies die Expression von *cfl2* in den Embryonalstadien E6.5, E7.5, E8.5 und E9.5 der Maus (Mus) nach. In der Negativkontrolle (–, PCR-Ansatz ohne cDNA) wurde kein Amplifikationsprodukt detektiert. Die Intensität der HPRT-Banden korreliert mit den eingesetzten cDNA-Mengen.

2.1.3. Transienter *Knockdown* von *cfl2* in Zebrafärbärlingembryonen

Um die Rolle von Cofilin 2 in der embryonalen Entwicklung zu untersuchen, wurde ein transienter *Knockdown* in Zebrafärbärlingembryonen durchgeführt (siehe 5.4.2.). Die Genfunktion von *cfl2* wurde durch zwei unterschiedliche Morpholinos inaktiviert (Abb. 16A). Das ATG-Morpholino bindet im Sequenzbereich des Startcodons der *cfl2*-mRNA und blockiert somit gezielt die Translationsinitiation. Die effektive Repression der Proteinsynthese konnte mit Hilfe einer Western Blot-Analyse gezeigt werden (Abb. 16B). Das Spleiß-Morpholino ist gegen die Grenze von Exon 2 zum Intron 2 der *cfl2*-prä-mRNA

gerichtet und inhibiert den korrekten Spleißvorgang. Eine RT-PCR-Analyse erbrachte den Nachweis, dass diese Spleißmodifikation zur Retention des zweiten Introns führte. Da der *Reverse*-Primer an eine Sequenz im Intron 2 bindet, konnten die Amplifikationsprodukte nur in *cf12*-Spl-Morphanten detektiert werden (Abb. 16C). Die Intronretention wurde zusätzlich durch die Sequenzierung des Gel-aufgereinigten PCR-Produktes verifiziert. Dieses fehlerhafte Spleißen hat eine Verschiebung des Leserahmens und ein vorzeitiges Stopp-Codon zur Folge. Nach der Injektion eines dieser Morpholinos in das Einzelstadium wurden die Morphanten am zweiten Tag der Entwicklung auf morphologische Auffälligkeiten untersucht. Im Vergleich mit unbehandelten Embryonen zeigten sowohl *cf12*-ATG- als auch *cf12*-Spl-Morphanten starke morphologische Defekte. Die Injektion des *cf12*-ATG- bzw. *cf12*-Spl-Morpholinos führte zu einer verkürzten anterior-posterioren Körperachse, wellenförmigen Chorda dorsalis, Krümmung der Körperlängsachse sowie einem kleinen Kopf und Augen (Abb. 16D, E). Des Weiteren wurde eine reduzierte Herzschlagfrequenz bei beiden *cf12*-Morphanten festgestellt. Während das Herz der 50 hpf alten Kontrolltiere 159 ± 3 mal pro Minute schlug, waren es bei den *cf12*-Morphanten nur 100 ± 9 Herzschläge pro Minute (Abb. 16F). Um die Spezifität der beiden *cf12*-Morpholinos zu belegen, wurde die gleiche Menge von einem Standard-Kontrollmorpholino injiziert. Dieses Morpholino ist gegen eine Mutation im humanen β -Globin-Gen gerichtet und übt keinen Einfluss auf die Entwicklung des Zebrafärblings aus. Die Kontrollmorpholino-injizierten Embryonen (Kontrollembryonen) zeigten keine morphologisch erkennbaren Defekte (Abb. 16D, E) und dienten als Kontrollen bei allen hier durchgeführten Experimenten.

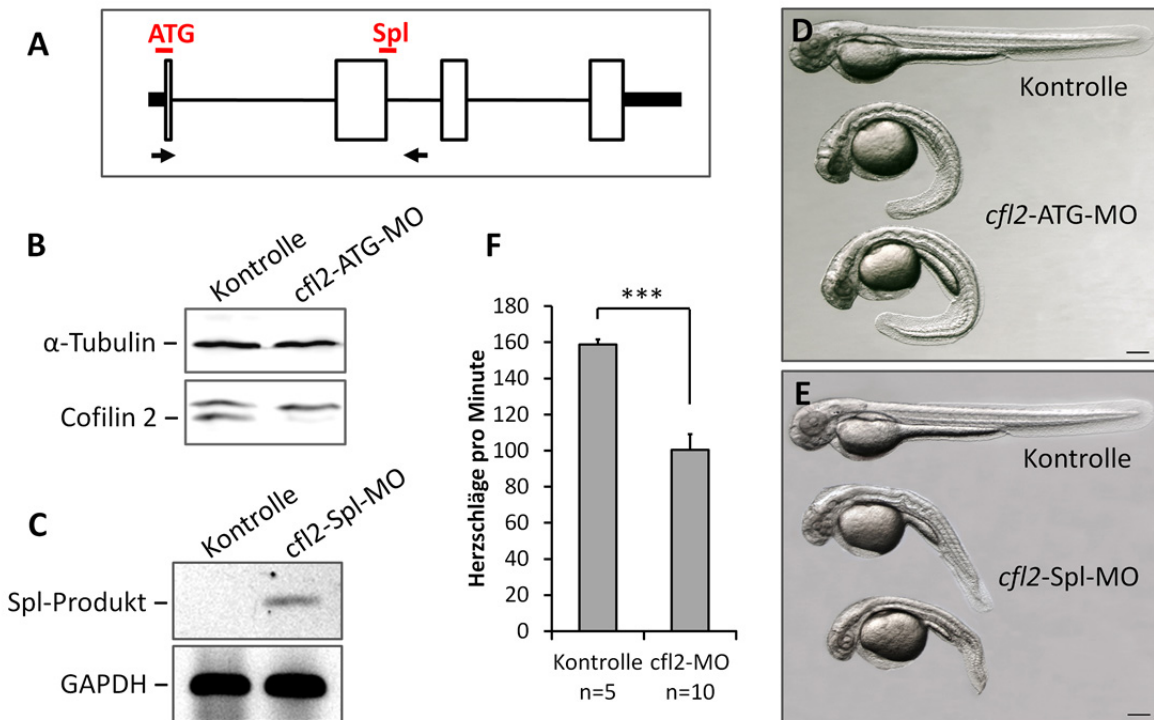


Abbildung 16. Morpholino-vermittelter Knockdown von *cfl2* im Zebrafärbling.

(A) Schematische Darstellung der Genstruktur von *cfl2* mit vier Exons (weiße Balken), drei Introns (Linien) und nicht-kodierenden Regionen (schwarze Balken) im Zebrafärbling. Die Bindungsstellen der Translations- (ATG) und Spleiß- (Spl) inhibierenden Morpholinos sind rot markiert. Die Pfeile weisen auf die Erkennungssequenz der PCR-Primer hin. (B) Eine Western Blot-Analyse bestätigte den effizienten Knockdown der *cfl2*-Expression durch das Translation-blockierende Morpholino. Die Intensität der α -Tubulin-Banden korreliert mit den eingesetzten Proteinmengen. (C) Mit der RT-PCR-Analyse konnte die Intronretention in den *cfl2*-Spl-Morphanten nachgewiesen werden. Die Intensität der GAPDH-Banden korreliert mit den eingesetzten cDNA-Mengen. In D und E sind lichtmikroskopische Aufnahmen der *cfl2*-ATG- und *cfl2*-Spl-Morphanten im direkten Vergleich mit den Kontrollembryonen bei 50 hpf gezeigt. Laterale Ansicht. Maßstab: 0,1 mm. (F) Grafische Darstellung der ermittelten Herzschläge pro Minute in Kontrollembryonen und *cfl2*-Morphanten bei 50 hpf. *** $p < 0,0001$. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

Um die Folgen der *cfl2*-Defizienz während der frühen Segmentierungsphase zu studieren, wurden phänotypische Untersuchungen der *cfl2*-Morphanten im 10-Somitenstadium durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt wurde wie auch schon bei 48 hpf alten *cfl2*-Morphanten eine kürzere Längsachse beobachtet (Abb. 17D). Im Vergleich zu den Kontrolltieren wiesen *cfl2*-defiziente Embryonen zusätzlich breitere Somiten und eine deformierte Chorda dorsalis auf (Abb. 17A, B).

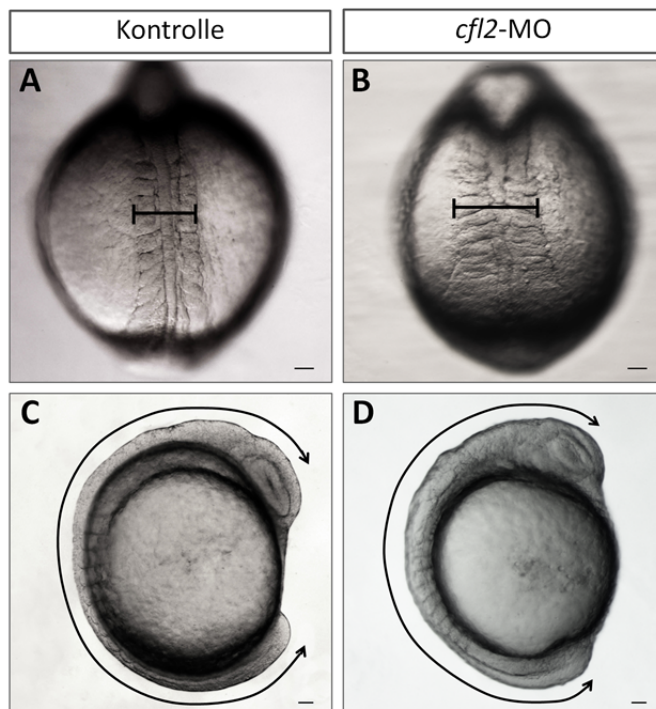


Abbildung 17. Phänotyp von *cfl2*-Morphanten während der Segmentierungsphase.

(A, B) Dorsale Ansicht der Zebrafischembryonen im 10-Somitenstadium. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A) wiesen *cfl2*-Morphanten (B) breitere Somiten auf. (C, D) Lateralansicht der Zebrafischembryonen im 10-Somitenstadium. Anders als Kontrollembryonen (C) zeigten *cfl2*-Morphanten (D) eine kürzere Längsachse. Maßstab: 0,1 mm.

2.1.4. Der *Knockdown* von *cfl2* löst Defekte in der Herzmorphogenese aus

Zur näheren Untersuchung des Herzphänotyps von *cfl2*-Morphanten wurde die transgene Fischlinie *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* eingesetzt, die Membran-gebundenes EGFP (engl.: *enhanced green fluorescent protein*) in allen Kardiomyozyten exprimiert. Mit Hilfe dieser Linie konnten die Effekte des *cfl2-Knockdowns* auf die Herzentwicklung konfokalmikroskopisch analysiert werden (siehe 5.4.8.). Im Vergleich zu den Kontrollembryonen wiesen *cfl2*-ATG- und *cfl2*-Spl-Morphanten eine defekte Herzmorphologie auf. Im Gegensatz zu den langgestreckten Kardiomyozyten der Kontrollherzen (Abb. 18A) zeichneten sich die Herzmuskelzellen der Morphanten durch ihre gedrungene Form aus. Des Weiteren war die Schleifenbildung des Herzens nach dem Verlust der *cfl2*-Funktion beeinträchtigt, so dass sich die Position beider Herzkammern nach der Ausbildung des linearen Herzschlauchs nur wenig veränderte (Abb. 18B, C).

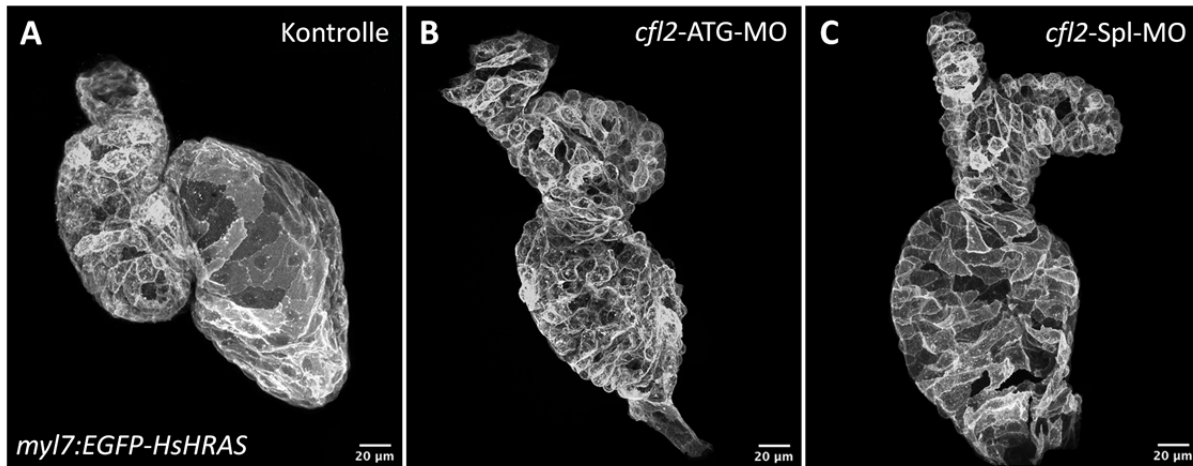


Abbildung 18. Herzphänotyp der *cfl2*-Morphanten.

(A-C) Dreidimensionale Projektionen konfokaler Serienschritte von *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Herzen. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A) zeigten *cfl2*-ATG- (B) und *cfl2*-Spl- (C) Morphanten eine gestörte Konfiguration und Morphologie der Kardiomyozyten bei 50 hpf.

Im Zuge der *Knockdown*-Studie konnte festgestellt werden, dass die Injektion zweier unterschiedlicher Morpholinos, *cfl2*-ATG und *cfl2*-Spl, denselben Phänotyp hervorbrachte. Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf des Kapitels nicht mehr zwischen *cfl2*-ATG- und *cfl2*-Spl-Morpholino unterschieden, stattdessen werden die damit behandelten Embryonen unter dem Begriff „*cfl2*-Morphanten“ zusammengefasst.

2.1.5. Cofilin 2 reguliert die Alcama-Lokalisation in den ventrikulären Kardiomyozyten und ihre morphologische Differenzierung

Um die phänotypischen Veränderungen infolge der *cfl2*-Defizienz auf subzellulärer Ebene zu verstehen, wurde aufgrund der Aktin-modulierenden Aktivität von Cofilin 2 das Aktinzytoskelett untersucht. Zu diesem Zweck wurden *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen zur Visualisierung des filamentösen Aktins (F-Aktin) mit Rhodamin-Phalloidin und zur Färbung der Zellkerne mit TO-PRO-3 bei 50 hpf behandelt (siehe 5.4.5.). Konfokalmikroskopisch erzeugte optische Schnitte zeigten deutliche morphologische Unterschiede zwischen Kontrollembryonen und *cfl2*-Morphanten. Die ventrikulären Kardiomyozyten der Kontrolltiere wiesen eine kubische (engl.: *cuboidal*) Form auf, mit zentral lokalisiertem und vom F-Aktin umgebenem Nukleus (Abb. 19A). Im Gegensatz dazu behielten die ventrikulären Herzmuskelzellen der *cfl2*-defizienten Embryonen die schuppenförmige (engl.: *squamous*) Morphologie bei, bei der das F-Aktin hauptsächlich auf der basalen und der Nukleus auf der apikalen Seite zu finden waren (Abb. 19B). Im Vorfeld dieser Arbeit wurden dieselben morphologischen Defekte mit identischer Organisation des Aktinzytoskeletts auch bei den

ventrikulären Kardiomyozyten von *alcama*-Morphanten von Dr. Benno Jungblut beobachtet (Abb. 5). Diese Erkenntnis deutet auf eine funktionelle Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 bei der Herzmorphogenese hin. Um diese Interaktion zu zeigen, wurde die subzelluläre Lokalisation der Alcama-Proteine in den Kardiomyozyten nach dem Verlust der *cfl2*-Funktion untersucht. Eine immunchemische Detektion von Alcama mit dem Antikörper zn-8 in *Tg(myI7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen bei 50 hpf zeigte, dass die *cfl2*-Defizienz zu einer veränderten Verteilung der Alcama-Moleküle in der Zellmembran ventrikulärer Kardiomyozyten führte. Während Alcama in den Kontrollherzen nur an den Zell-Zellkontakten detektiert wurde (Abb. 19C, C'), waren die Alcama-Proteine gleichmäßig auf der Zelloberfläche der ventrikulären Kardiomyozyten von *cfl2*-defizienten Embryonen verteilt (Abb. 19D, D'). Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass Cofilin 2 für die morphologischen Veränderungen der Herzmuskelzellen sowie für die korrekte Lokalisation von Alcama in der ventrikulären Kardiomyozytenmembran benötigt wird.

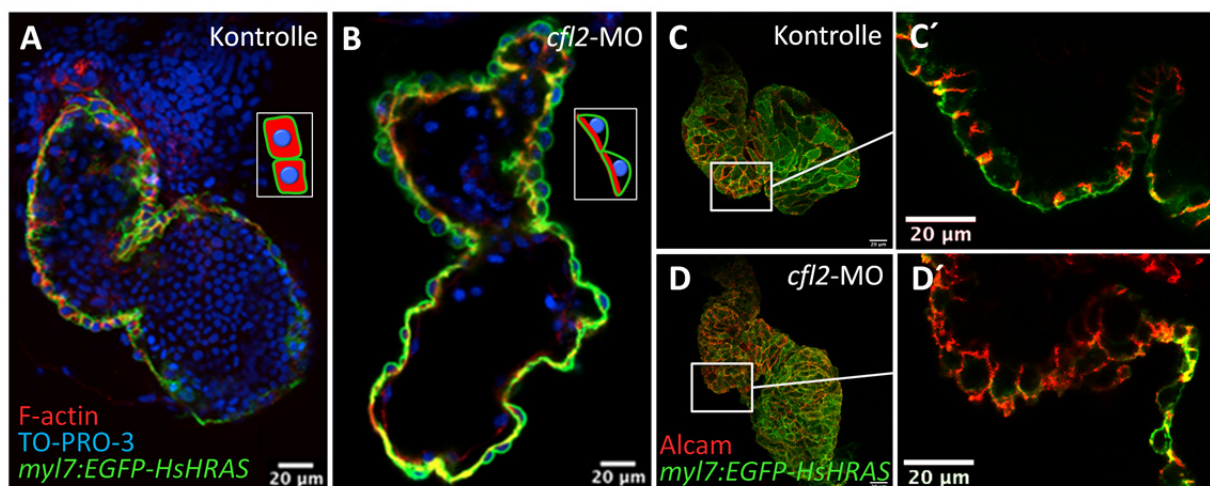


Abbildung 19. Ventrikuläre Kardiomyozyten der *cfl2*-Morphanten weisen eine anormale Morphologie und eine veränderte Alcama-Lokalisation auf.

(A, B) Optische Schnitte durch *Tg(myI7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Herzen, die mit TO-PRO-3 und Rhodamin-Phalloidin bei 50 hpf angefärbt wurden. Die ventrikulären Kardiomyozyten der Kontrollembryonen (A) nahmen die kubische Organisation des F-Aktins an, die im Ausschnitt schematisch dargestellt ist. Die ventrikulären Kardiomyozyten der *cfl2*-Morphanten wiesen eine schuppenförmige Morphologie auf (B mit schematischer Zeichnung). (C-D) Konfokale Aufnahmen von *Tg(myI7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Herzen, in denen Alcama bei 50 hpf immunchemisch detektiert wurde. In Kontrollembryonen (C, C') war Alcama an Zell-Zellkontakten lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeigten die Herzen *cfl2*-defizienter Embryonen (D, D') eine gleichmäßige Verteilung der Alcama-Proteine in der ventrikulären Kardiomyozytenmembran. (C', D') Optischer Schnitt und höhere Vergrößerung der markierten Herzregion in C bzw. D.

2.1.6. Die Cofilin 2-abhängige Kontrolle der Kardiomyozytenzahl ist Herzkammer-spezifisch

Zur Beantwortung der Frage, ob der Herzphänotyp der *cf/2*-Morphanten zusätzlich zu den morphologischen Veränderungen auch auf eine veränderte Anzahl der Kardiomyozyten zurückzuführen ist, wurden die Herzmuskelzellen in der doppelt-transgenen Linie *Tg(myf7:EGFP-HsHRAS)^{s883}; Tg(-5.1myf7:nDsRed2)^{f2}* quantifiziert (siehe 5.6.2.). Im Gegensatz zu EGFP benötigt das DsRed-Protein mehrere Stunden für seinen Reifungsprozess und die Fluoreszenz ist erst etwa 24 Stunden nach Beginn seiner Expression sichtbar (Lepilina *et al.*, 2006; Verkhusha *et al.*, 2001). Um das DsRed schon zu früheren Zeitpunkten zu visualisieren, wurde ein anti-DsRed-Antikörper eingesetzt. Des Weiteren wurde zur besseren Unterscheidung zwischen atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten der S46-Antikörper verwendet, der gegen die Atrium-spezifische schwere Myosinkette (engl.: *atrial myosin heavy chain*, AMHC) gerichtet ist. Die Quantifizierung der DsRed-positiven Zellkerne bei 28 hpf ergab einen signifikanten, 29 %-igen Anstieg der atrialen Zellzahl in *cf/2*-defizienten Tieren gegenüber den Kontrollembryonen. Gleichzeitig wurde eine signifikante Reduktion der ventrikulären Kardiomyozytenzahl um 15 % als Folge der *cf/2*-Defizienz festgestellt (Abb. 20B). In diesem Stadium wurden bei den Kontrolltieren 117±6 atriale und 120±10 ventrikuläre Kardiomyozyten detektiert, bei den *cf/2*-Morphanten waren es dagegen 151±15 Atrium-spezifische und 102±9 Ventrikel-spezifische Zellen (Abb. 20C). In den nächsten 22 Stunden, während der Ausbildung der Herzscheife, nahm die ventrikuläre Kardiomyozytenzahl um etwa 60 Zellen in den Kontrollherzen zu. Diese Zunahme der ventrikulären Zellzahl wurde jedoch nicht in *cf/2*-Morphanten beobachtet. Daher war die Kardiomyozytenzahl im Ventrikel *cf/2*-defizienter Embryonen bei 50 hpf um 28 % gegenüber dem Kontrollventrikel reduziert. Analog zu den atrialen Zellzahlen bei 28 hpf wiesen die 50 hpf alten *cf/2*-Morphanten 34 % mehr Atrium-spezifische Kardiomyozyten als die Kontrollembryonen auf (Abb. 20D, E). Bei 50 hpf wurden bei den Kontrolltieren 119±6 atriale und 179±11 ventrikuläre Zellen quantifiziert, während es bei den *cf/2*-Morphanten 160±13 Kardiomyozyten im Atrium und lediglich 129±11 Herzmuskelzellen im Ventrikel waren (Abb. 20F). Diese quantitativen Untersuchungen zeigen somit, dass Cofilin 2 die Anzahl der Kardiomyozyten während der kardialen Morphogenese Herzkammer-spezifisch reguliert.

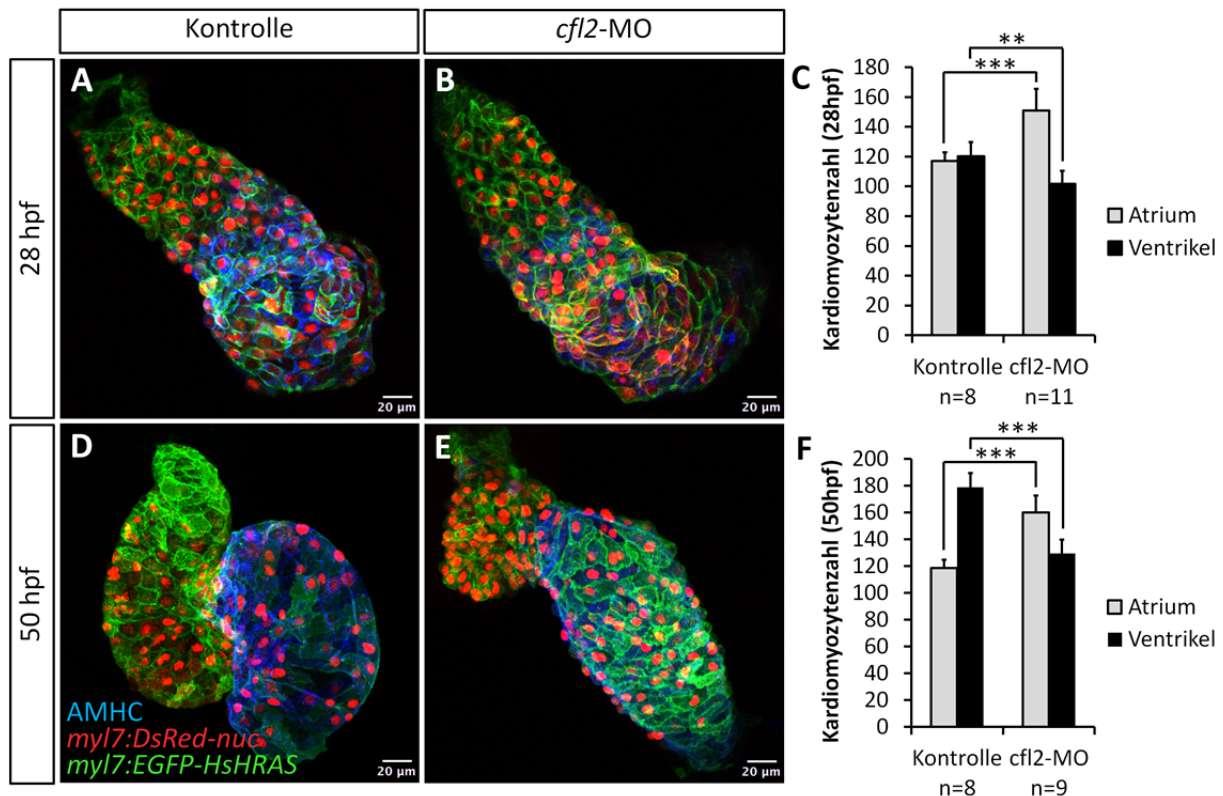


Abbildung 20. Der Verlust von *cf12* führt zu Herzkammer-spezifischen Veränderungen der Kardiomyozytenzahlen.

(A, B, D, E) Konfokale Aufnahmen von *Tg(my17:EGFP-HsHRAS)^{s883}; Tg(-5.1my17:nDsRed2)^{f2}* Embryonen, die einer immunchemischen Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen DsRed und AMHC zu den angegebenen Stadien unterzogen wurden. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A) resultierte der *Knockdown* von *cf12* in einer erhöhten Anzahl an atrialen Kardiomyozyten und reduzierter Zellzahl im Ventrikel bei 28 hpf (B). Bei 50 hpf zeigten die Herzen *cf12*-defizienter Embryonen (E) mehr atriale und weniger ventrikuläre Kardiomyozyten als die Kontrollherzen (D). (C, F) Grafische Darstellung der Quantifizierungsergebnisse. *** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0047$. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.1.7. Aktin-Inhibitoren haben keinen Einfluss auf die Kardiomyozytenzahl

Um die Spezifität der kardialen Defekte nach dem *cf12*-*Knockdown* weiterhin zu bekräftigen, erfolgte die Exposition der Embryonen mit Cytochalasin D und Latrunculin B. Damit sollte gezeigt werden, dass diese Inhibitoren der Aktinpolymerisation die Herzmorphogenese in Zebrabärblingembryonen nicht auf die gleiche Weise beeinflussen wie der Verlust der *cf12*-Funktion. Dazu wurden *Tg(my17:EGFP-HsHRAS)^{s883}; Tg(-5.1my17:nDsRed2)^{f2}* Embryonen im Zeitraum vom 21-Somitenstadium bis 48 hpf mit 20 μ M Cytochalasin D bzw. 2 μ M Latrunculin B im E3-Medium inkubiert (siehe 5.4.4.). Die behandelten Embryonen wurden bei 48 hpf einer immunchemischen Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen DsRed und AMHC unterzogen, die die anschließende Quantifizierung ihrer Kardiomyozyten erleichterte (siehe 5.6.2.). Quantitative Untersuchungen ergaben keine signifikanten Änderungen der

2. Ergebnisse

Kardiomyozytenzahlen der Cytochalasin D- bzw. Latrunculin B-behandelten Embryonen im Vergleich zu den DMSO-Kontrolltieren. Nach der Exposition mit Cytochalasin D wurden im Atrium 120 ± 6 und im Ventrikel 161 ± 9 Kardiomyozyten bei 48 hpf festgestellt (Abb. 21B, D). Infolge der Latrunculin B-Behandlung wurden 113 ± 13 atriale und 157 ± 16 ventrikuläre Zellen quantifiziert (Abb. 21C, D), während die DMSO-Kontrollen 108 ± 5 atriale und 166 ± 6 ventrikuläre Kardiomyozyten aufwiesen (Abb. 21A, D). Demnach hat die Behandlung der Embryonen mit diesen Aktin-Inhibitoren keine Auswirkungen auf die Kardiomyozytenzahlen im sich entwickelnden Herzen des Zebrafärblings.

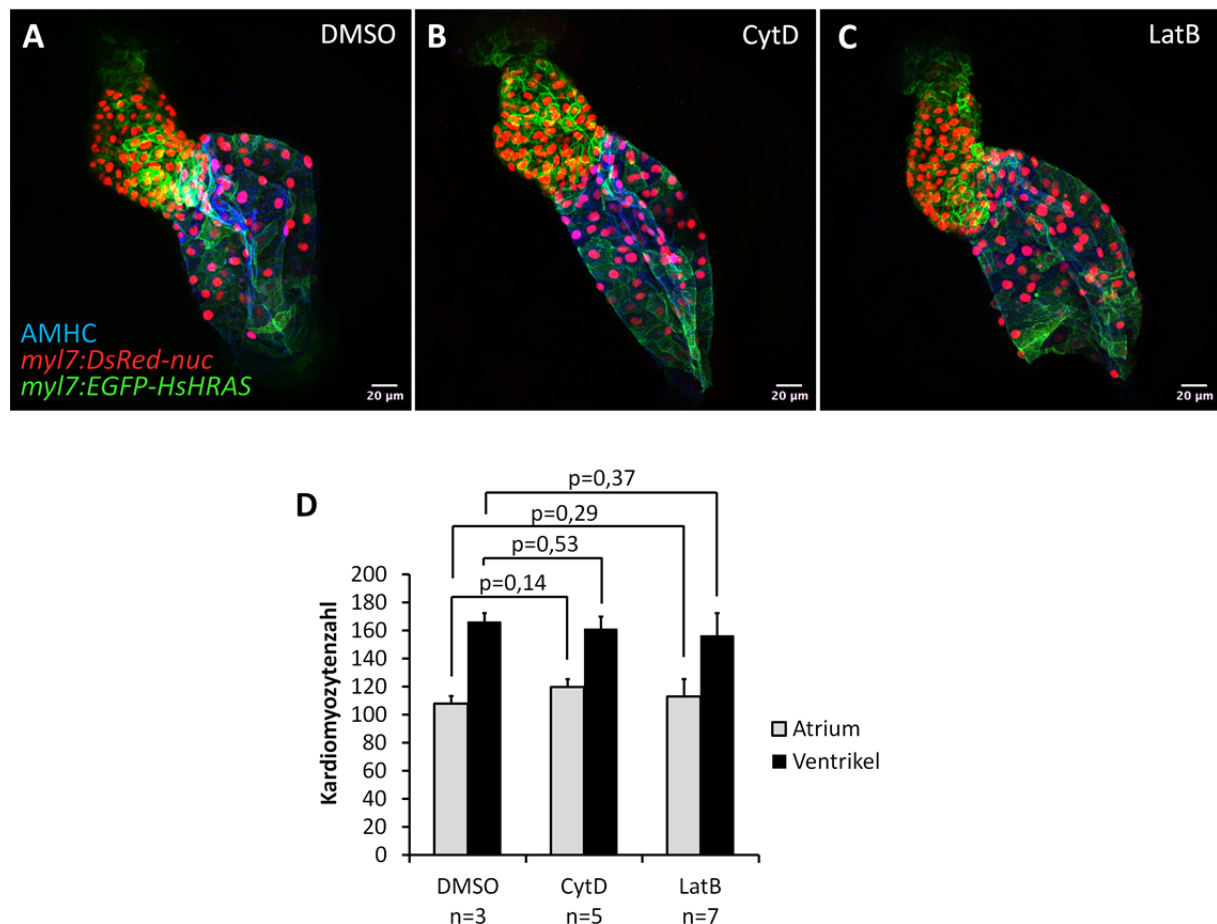


Abbildung 21. Aktin-Inhibitoren beeinträchtigen nicht die Anzahl der Kardiomyozyten im sich entwickelnden Herzen.

(A-C) Konfokale Aufnahmen von *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}*; *Tg(-5.1myl7:nDsRed2)^{f2}* Embryonen, die einer immunchemischen Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen DsRed und AMHC bei 48 hpf unterzogen wurden. Die Behandlung mit Cytochalasin D (CytD, B) oder mit Latrunculin B (LatB, C) führte im Vergleich zu den DMSO-Kontrollembryonen (A) zu keinen signifikanten Unterschieden in der atrialen oder ventrikulären Kardiomyozytenzahl. (D) Grafische Darstellung der Quantifizierungsergebnisse. Die p-Werte ließen keine statistische Signifikanz erkennen. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.1.8. Cofilin 2-Funktion wird für die *vmhc*-Expression in den SHF-Zellen benötigt

Um den frühesten Zeitpunkt in der Entwicklung zu bestimmen, bei dem der *Knockdown* von *cfl2* einen ventrikulären Phänotyp hervorruft, wurde die Expression von *vmhc* (Ventrikelspezifische schwere Myosinkette; engl.: *ventricular myosin heavy chain*) in den verschiedenen Entwicklungsstadien analysiert. Zu diesem Zweck durchgeführte *in situ*-Hybridisierungen zeigten, dass die Expression von *vmhc* in den bilateralen Herzfeldern (15-Somitenstadium) und im *Cardiac Cone* (21-Somitenstadium) nach dem Verlust der *cfl2*-Funktion unverändert blieb (Abb. 22A-D). Die *vmhc*-Expressionsdomäne war jedoch in *cfl2*-Morphanten im Vergleich zu den Kontrolltieren ab 28 hpf deutlich reduziert. Bei 28 und 32 hpf konnten die *vmhc*-Transkripte im Ventrikel der Kontrollembryonen detektiert werden und zusätzlich in den Zellen, die zum arteriellen Pol rekrutiert wurden (Pfeile in Abb. 22E, G). Diese *vmhc*-exprimierende Zellpopulation, die aus dem zweiten Herzfeld (engl.: *second heart field*, SHF) stammt (Lazic und Scott, 2011), fehlte nahezu vollständig in *cfl2*-Morphanten (Abb. 22F, H). Diese Expressionsstudien demonstrieren, dass Cofilin 2 für die *vmhc*-Expression in jenen Zellen benötigt wird, die mit der Initiierung der kardialen Schleifenbildung aus dem SHF zum arteriellen Pol rekrutiert werden.

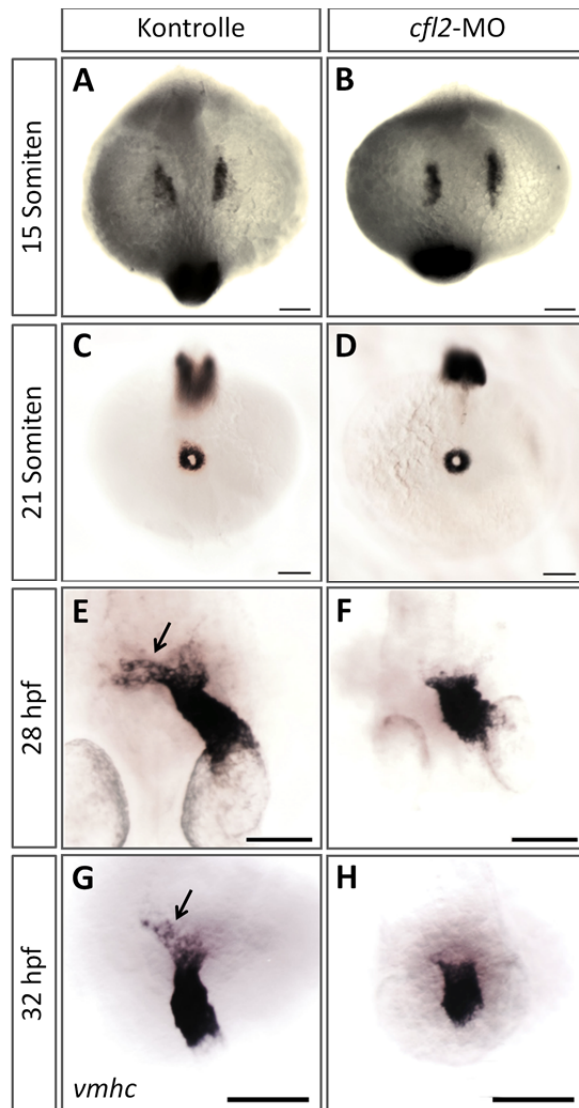


Abbildung 22. Reduzierte *vmhc*-Expression ab 28 hpf in *cfl2*-Morphanten.

(A-H) Lichtmikroskopische Aufnahmen nach der *Whole Mount in situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *vmhc*-Expression zu den angegebenen Stadien. Im 15- und 21-Somitenstadium waren die *vmhc*-Expressionsdomänen der *cfl2*-Morphanten (B, D) vergleichbar mit denen der Kontrollembryonen (A, C). Die Kontrollembryonen exprimierten *vmhc* bei 28 und 32 hpf in den SHF-Zellen (Pfeil in E, G), diese Expression fehlte jedoch in *cfl2*-Morphanten (F, H). (A-B) dorsale Ansicht, der Kopf ist nach oben orientiert; (C-H) dorsale Ansicht, der Kopf ist nach unten orientiert. Maßstab: 0,1 mm.

2.1.9. Cofilin 2 hat keinen negativen Einfluss auf die Spezifizierung der kardiovaskulären Vorläuferzellen

Um zu klären, ob ein Spezifizierungsdefekt zu dem Verlust der ventrikulären Zellen am arteriellen Pol der *cfl2*-Morphanten führt, wurde die Expression von Markern für kardiovaskuläre Vorläuferzellen analysiert. Zunächst wurde die Präsenz der Isl-positiven SHF-Zellen am distalen Ende des Ventrikels bei 28 hpf überprüft. In *Tg(myf7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen erfolgte die Immundetektion von Isl mit einem Antikörper, der gegen Isl1 und

Isl2 gerichtet war (siehe 5.4.5.). Konfokal-mikroskopische Untersuchungen zeigten Isl-exprimierende Zellen im extra-myokardialen Bereich des arteriellen Pols von Kontroll- und *cfl2*-defizienten Embryonen (Abb. 23A, B). Des Weiteren erfolgte die Analyse der Nkx2.5-Expression, eines konservierten Markers für kardiale Vorläuferzellen, der auch in SHF-Zellen von Zebrafärbembryonen exprimiert wird (Zhou *et al.*, 2011). Zur Amplifikation des GFP-Signals in *Tg(nkx2.5:GFP)* Embryonen wurde eine GFP-Immunfluoreszenzfärbung bei 30 hpf durchgeführt. Unter Verwendung der konfokalen Mikroskopie konnten die SHF-Zellen, die GFP unter der Kontrolle des *nkx2.5*-Promotors exprimieren, sowohl in Kontroll- als auch in *cfl2*-defizienten Embryonen detektiert werden (Pfeile in Abb. 23C, D). Als dritter Marker wurde Kdrl (auch als Flk1 bekannt) untersucht, da Zellen, die *isl1* und *kdr1* co-exprimieren, vaskuläre Vorläuferzellen darstellen (Moretti *et al.*, 2006). Zur Visualisierung dieser Zellen wurden *Tg(kdrl:EGFP)⁵⁸⁴³* Embryonen einer Immundoppelfärbung mit den Antikörpern gegen Isl und GFP bei 30 hpf unterzogen. Isl/Kdrl-co-exprimierende Zellen konnten am arteriellen Pol der Kontrolltiere und der *cfl2*-Morphanten nachgewiesen werden (Abb. 23E, F). Somit zeigen diese immunchemischen Färbungen, dass Cofilin 2 keinen negativen Einfluss auf die Expression von Isl, Nkx2.5 und Kdrl am arteriellen Pol hat.

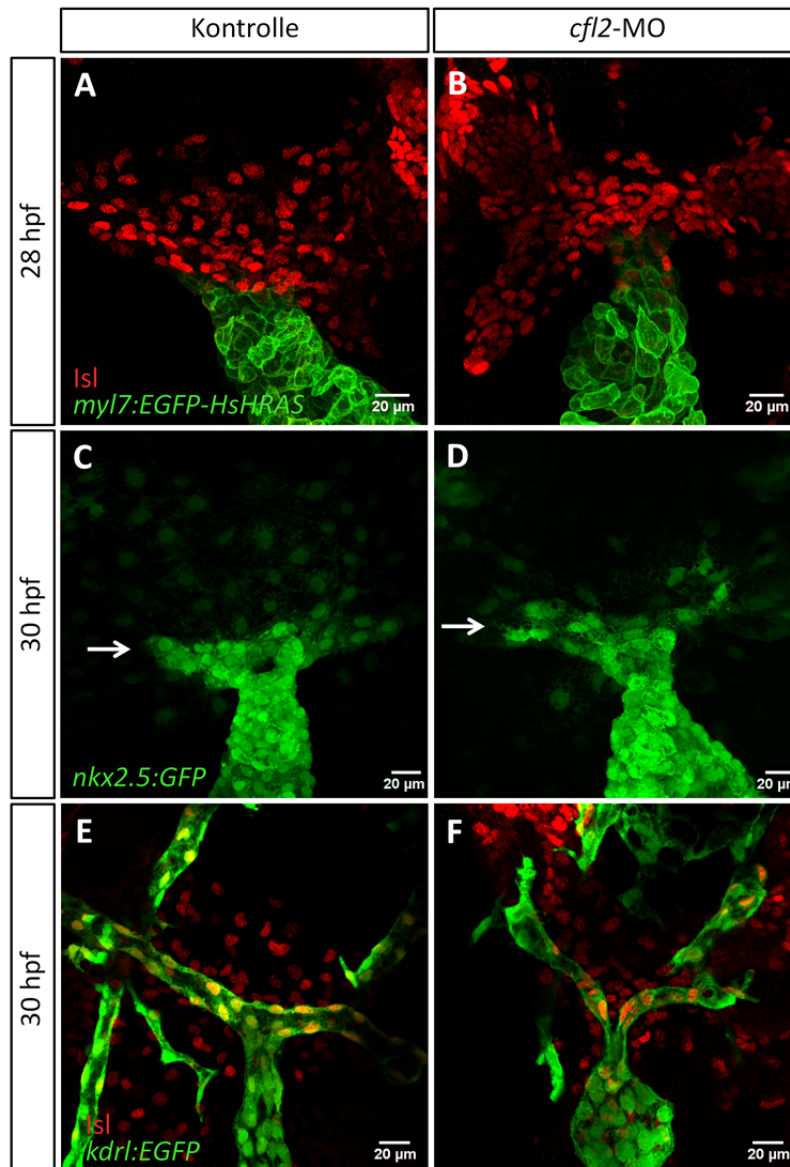


Abbildung 23. Nachweis der kardiovaskulären Vorläuferzellen am arteriellen Pol der *cfl2*-Morphanten. (A, B) Immundetektion von Isl in *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen bei 28 hpf. Isl-exprimierende Zellen wurden in der extra-kardialen Region des arteriellen Pols von Kontrollembryonen und *cfl2*-Morphanten detektiert. (C, D) *Tg(nkx2.5:GFP)* Herzen nach einer GFP-Immunfluoreszenzfärbung bei 30 hpf. Das GFP-Signal wurde in SHF-Zellen der Kontrollembryonen und *cfl2*-Morphanten beobachtet (mit Pfeil markiert). (E, F) *Tg(kdrl:EGFP)^{s843}* Embryonen nach einer immunchemischen Doppelfärbung mit den Antikörpern gegen GFP und Isl bei 30 hpf. Am arteriellen Pol und im angrenzenden Bereich wurden vaskuläre Vorläuferzellen in Kontrollembryonen und in *cfl2*-Morphanten nachgewiesen.

2.1.10. Cofilin 2 fördert die Differenzierung von glatten Muskelzellen am arteriellen Pol

Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob eine mögliche Transdetermination zu einer reduzierten Anzahl an ausdifferenzierten Kardiomyozyten und dafür vermehrt zur Differenzierung zu glatten Muskelzellen und/oder zu Endothelzellen am arteriellen Pol führt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zunächst die Endothelzellen im Ausflusstrakt der

cf12-Morphanten konfokal-mikroskopisch analysiert. Hierfür wurden *Tg(kdrl:EGFP)⁸⁴³* Embryonen bei 48 hpf auf morphologische Auffälligkeiten untersucht. Im Vergleich zu den Kontrolltieren konnten bei *cf12*-defizienten Embryonen keine Anomalien festgestellt werden (Abb. 24).

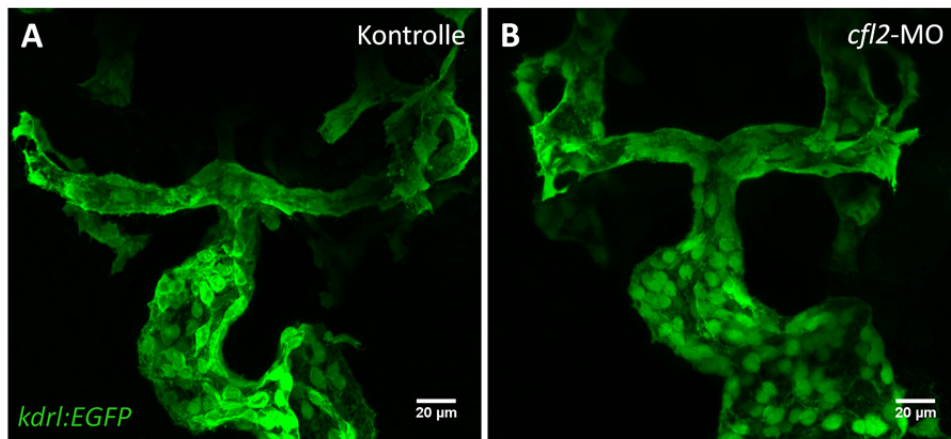


Abbildung 24. Der Knockdown von *cf12* hat keine Auswirkungen auf die Endothelzellen im Ausflusstrakt. (A, B) Konfokale Aufnahmen von *Tg(kdrl:EGFP)⁸⁴³* Embryonen bei 48 hpf. Der Vergleich von Endothelzellen im Ausflusstrakt der Kontrollembryonen (A) mit denen der *cf12*-Morphanten (B) zeigt keine auffälligen Abweichungen. Es wurden keine ektopischen *kdrl*-exprimierenden Zellen in dieser Region nach dem Knockdown von *cf12* detektiert.

Anschließend wurde die glatte Muskulatur des Bulbus Arteriosus mittels des Stickstoffmonoxid- (NO) Indikators DAF-FM in *Tg(my17:mCherry-HsHRAS)^{sd21}* Embryonen markiert (siehe 5.4.7.). Die Erzeugung der Fluoreszenz in Anwesenheit des Stickstoffmonoxids ließ erkennen, dass der Bulbus Arteriosus in *cf12*-Morphanten im Vergleich zu den Kontrollembryonen am dritten (Abb. 25A, B) und vierten Tag nach der Fertilisation (Abb. 25C, D) deutlich reduziert war. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Verlust der *cf12*-Funktion keine Auswirkungen auf die Endothelzellen im Ausflusstrakt hat, jedoch in einer Reduktion sowohl des Ventrikels als auch des Bulbus Arteriosus resultiert.

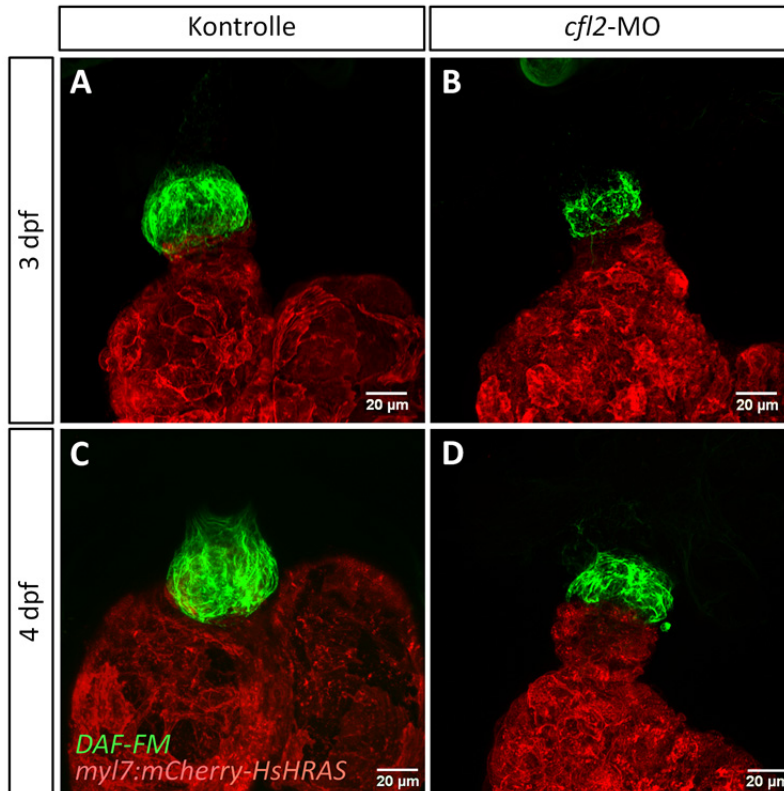


Abbildung 25. Reduzierter Bulbus Arteriosus in *cfl2*-Morphanten.

(A-D) Konfokale Aufnahmen von DAF-FM-markierten *Tg(myl7:mCherry-HsHRAS)^{sd21}* Embryonen zu den angegebenen Stadien. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A, C) zeigten *cfl2*-Morphanten bei 3 und 4 dpf (Tage nach der Befruchtung; engl.: *days post fertilization*) einen reduzierten Bulbus Arteriosus (B, D).

2.1.11. Cofilin 2 wird für die *mef2cb*-Expression in den SHF-Zellen am arteriellen Pol benötigt

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Differenzierungsdefekt zu einem reduzierten Ventrikel in *cfl2*-Morphanten führt. Zur Prüfung dieser Annahme wurde die Expression von *mef2cb* mittels *in situ*-Hybridisierungen analysiert. Mef2cb ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine Schlüsselfunktion bei der terminalen Kardiomyozytendifferenzierung am arteriellen Pol der Zebrafisch-embryonen zugesprochen wird (Lazic und Scott, 2011; Hinitz *et al.*, 2012). Durch die RNA-Expressionsstudie konnten die Transkripte von *mef2cb* im Ventrikel der Kontrolltiere sowie in den zum arteriellen Pol migrierenden Zellen detektiert werden (Pfeil in Abb. 26A). In den *cfl2*-Morphanten wurde hingegen die *mef2cb*-Expression nur im Ventrikel, jedoch nicht in den SHF-Zellen nachgewiesen (Pfeil in Abb. 26B). Diese Expressionsstudie zeigt somit, dass Cofilin 2 für die *mef2cb*-Expression in den SHF-Zellen am arteriellen Pol benötigt wird.

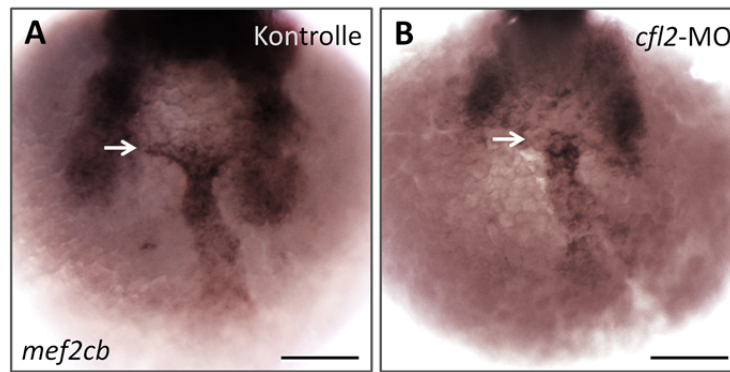


Abbildung 26. Reduzierte *mef2cb*-Expressionsdomäne in *cfl2*-Morphanten.

(A, B) Lichtmikroskopische Aufnahmen nach der *Whole Mount in situ*-Hybridisierung zur Visualisierung der *mef2cb*-Expression bei 30 hpf. In den Kontrollembryonen (A) wurde *mef2cb* in den zum arteriellen Pol migrierenden Zellen (mit Pfeil markiert) exprimiert, während diese SHF-Zellen nicht in den *cfl2*-Morphanten (B) detektierbar waren. Ventrale Ansicht nach dem Entfernen des Kopfes, der nach oben orientiert war. Maßstab: 0,1 mm.

2.1.12. Cofilin 2 kontrolliert die *amhc*-Expression nach dem 26-Somitenstadium

Der *Knockdown* von *cfl2* beeinträchtigt neben der ventrikulären Kardiomyozytenzahl auch die Anzahl der atrialen Herzmuskelzellen (siehe 2.1.6.). Die Frage nach dem Entwicklungsstadium, in dem der atriale Phänotyp der *cfl2*-Morphanten zum ersten Mal auftritt, sollte mit Hilfe der *in situ*-Hybridisierungen für *amhc* beantwortet werden. Die Expression von *amhc* wird im 19-Somitenstadium des Zebrafärbflingembryos eingeleitet (Berdougo *et al.*, 2003), etwa drei Stunden nach der Initiierung der *vmhc*-Expression. *Amhc* wird ausschließlich in atrialen Zellen exprimiert. Übereinstimmend mit den Resultaten aus der Quantifizierung der atrialen Kardiomyozyten (Abb. 20), wurde in *cfl2*-Morphanten eine größere *amhc*-Expressionsdomäne im Vergleich zu den Kontrollembryonen bei 28 hpf beobachtet (Abb. 27C, D). Sechs Stunden zuvor, im 26-Somitenstadium, wurde hingegen keine Veränderung der *amhc*-Expression infolge der *cfl2*-Defizienz festgestellt (Abb. 27A, B). Demnach werden die überschüssigen, *amhc*-exprimierenden Zellen zwischen 22 hpf (26-Somitenstadium) und 28 hpf dem Atrium von *cfl2*-defizienten Embryonen hinzugefügt.

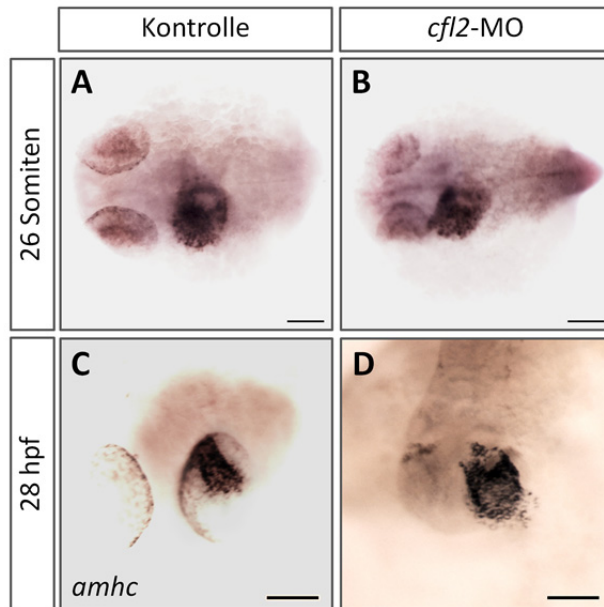


Abbildung 27. Vergrößerte *amhc*-Expressionsdomäne in *cf/2*-Morphanten bei 28 hpf.

(A-D) Expressionsanalyse von *amhc* mittels *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen zu den angegebenen Stadien. (A, B) Im 26-Somitenstadium war die *amhc*-Expression der *cf/2*-Morphanten (B) vergleichbar mit der der Kontrollembryonen (A). Dorsale Ansicht, der Kopf ist nach links orientiert. (C, D) Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (C) wurde in *cf/2*-Morphanten (D) eine Expansion der *amhc*-Expressionsdomäne bei 28 hpf detektiert. Dorsale Ansicht, der Kopf ist nach unten orientiert. Maßstab: 0,1 mm

2.1.13. Cofilin 2 hat keinen Einfluss auf die Proliferation atrialer Zellen

Im nächsten Schritt sollte mittels BrdU-Inkorporation ermittelt werden, ob eine gesteigerte Zellproliferation die Ursache für die erhöhte Kardiomyozytenzahl im Atrium von *cf/2*-defizienten Embryonen darstellt. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden *Tg(-5.1myl7:nDsRed2)^{f2}* Embryonen zwischen dem 21-Somitenstadium und 28 hpf mit 10 mM BrdU behandelt (siehe 5.1.8.) und bei 48 hpf einer BrdU-Immundetektion unterzogen. Konfokal-mikroskopische Untersuchungen ergaben, dass in den Kontrollherzen die wenigen proliferierende Zellen auf beide kardiale Pole beschränkt waren (Pfeile in Abb. 28A). Am arteriellen Pol wurden 9 ± 4 und am venösen Pol 5 ± 2 BrdU-positive Zellkerne quantifiziert (Abb. 28C). Im Vergleich zu den Kontrollembryonen war die Anzahl BrdU-inkorporierender Zellen am arteriellen Pol von *cf/2*-defizienten Embryonen signifikant reduziert, während diese am venösen Pol unverändert blieb (Pfeile in Abb. 28B). Am arteriellen Pol der *cf/2*-Morphanten wurden 1 ± 1 und am venösen Pol 7 ± 2 BrdU-positive Kardiomyozyten detektiert (Abb. 28C). Diese Daten zeigen, dass die erhöhte Kardiomyozytenzahl im Atrium *cf/2*-defizienter Embryonen nicht auf eine gesteigerte Zellproliferation zurückzuführen ist.

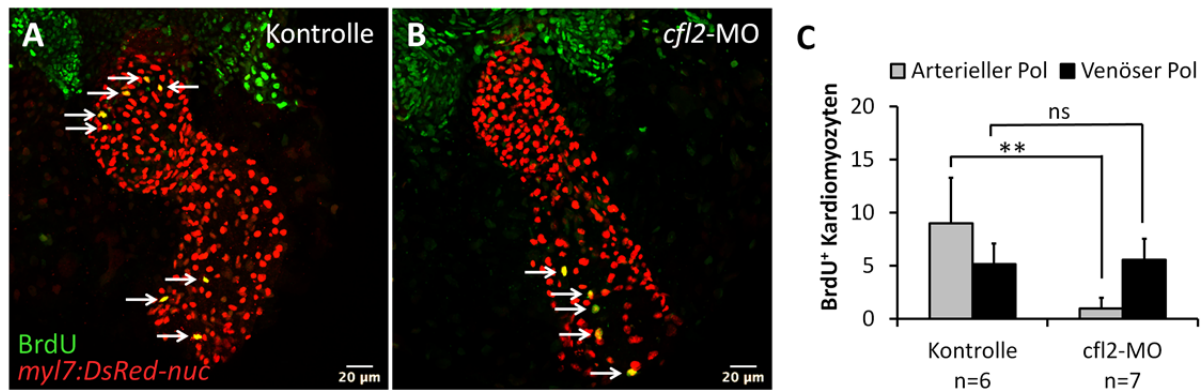


Abbildung 28. Unveränderte Proliferation atrialer Zellen in *cfl2*-Morphanten.

(A, B) *Tg(-5.1myl7:nDsRed2)^{l2}* Embryonen wurden zwischen dem 21-Somitenstadium und 28 hpf mit BrdU markiert und bei 48 hpf konfokal-mikroskopisch untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A) war die Anzahl proliferierender Zellen am arteriellen Pol der *cfl2*-Morphanten signifikant reduziert, während diese am venösen Pol unverändert blieb (B). Pfeile markieren sichtbare DsRed⁺-BrdU⁺-überlappende Signale. (C) Grafische Darstellung der Quantifizierungsergebnisse. ns: nicht signifikant, p=0,5761; ** p=0,0081. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.1.14. Cofilin 2 agiert *upstream* von *Isl* und limitiert seine Expression am venösen Pol

Vorherige Studien zeigen, dass für die Vollendung der kontinuierlichen Kardiomyozyten-differenzierung am venösen Pol die Funktion des Transkriptionsfaktors *Isl1* benötigt wird (de Pater *et al.*, 2009). Basierend auf diesen Erkenntnissen sollte geklärt werden, ob die erhöhte Kardiomyozytenzahl im Atrium der *cfl2*-Morphanten von einer anormalen *isl1*-Expression begleitet wird. Zu diesem Zweck erfolgte eine Immundetektion von *Isl* in *Tg(myI7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen zu unterschiedlichen Stadien mit einem Antikörper, der gegen *Isl1* und *Isl2* gerichtet war. Die Quantifizierung *Isl*-exprimierender Kardiomyozyten zeigte, dass die *cfl2*-Morphanten bei 28 hpf 45 % mehr *Isl*-positive Kardiomyozyten am venösen Pol aufwiesen als die Kontrollembryonen (Abb. 29A, B). Hierbei wurden in Kontrolltieren 53±6 und in *cfl2*-defizienten Embryonen 77±8 *Isl*-exprimierende Zellen im Atrium quantifiziert (Abb. 29E). Bei 36 hpf zeigten *cfl2*-Morphanten nahezu doppelt so viele *Isl*-positive Kardiomyozyten wie die Kontrollembryonen (Abb. 29C, D). In diesem Stadium wurden in den Kontrollen 29±2 und in *cfl2*-defizienten Embryonen 57±8 *Isl*-positive Zellen am venösen Pol erfasst (Abb. 29E). Demnach zeigen diese Daten, dass Cofilin 2 *upstream* von *Isl* agiert, um dessen Expression am venösen Pol zu limitieren.

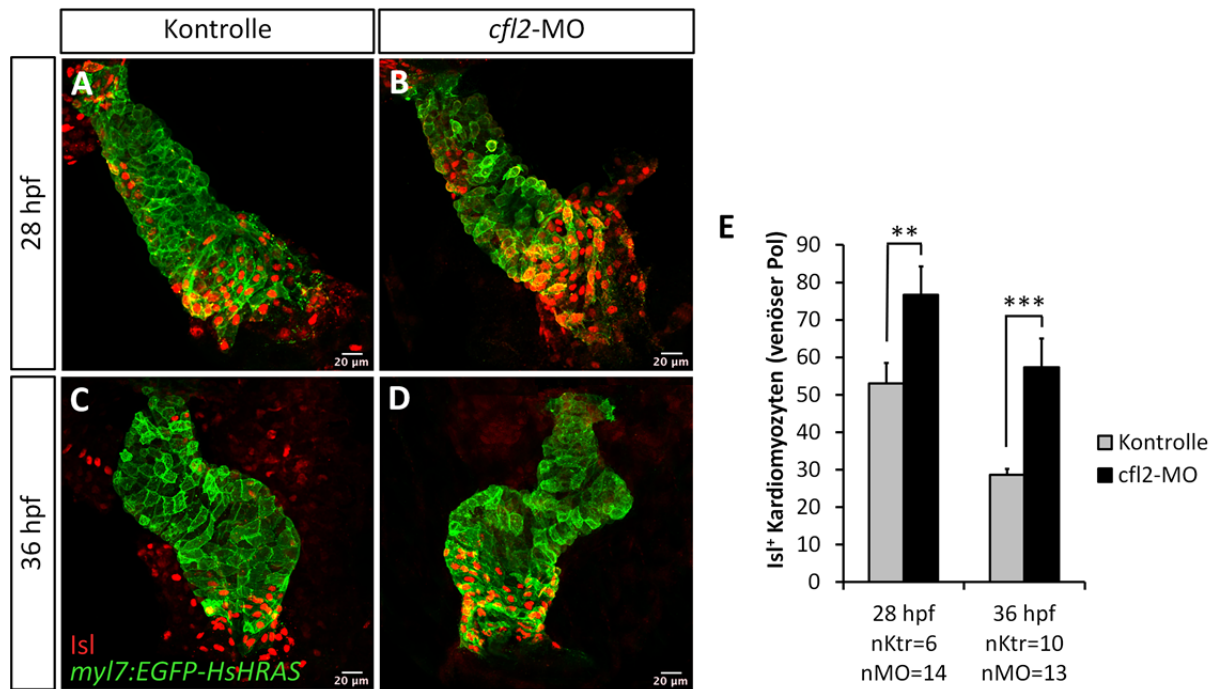


Abbildung 29. Erhöhte Anzahl an Isl⁺-Kardiomyozyten am venösen Pol der *cfl2*-Morphanten. (A-D) Immundetektion von Isl in Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883} Embryonen bei 28 und 36 hpf. Zu beiden Zeitpunkten wurden signifikant mehr Isl-positive Kardiomyozyten am venösen Pol der *cfl2*-Morphanten (B, D) im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A, C) detektiert. (E) Grafische Darstellung der Quantifizierungsergebnisse. ** p=0,0095; *** p<0,0001. n_{Ktr}=Anzahl der untersuchten Kontrollembryonen; n_{MO}=Anzahl der untersuchten *cfl2*-Morphanten.

2.1.15. Cofilin 2 limitiert die Transkription von *isl1* am venösen Pol

Die aus der Immunfluoreszenz gewonnenen Erkenntnisse lassen keine Aussage darüber treffen, ob die Isl1-Funktion nach dem *Knockdown* von *cfl2* auf Proteinebene beeinflusst oder ob seine Transkription verändert wird. Für die Analyse auf RNA-Ebene wurden *in situ*-Hybridisierungen mit einer spezifischen *isl1*-Sonde durchgeführt. Im Vergleich mit den Kontrollembryonen war die Expression von *isl1* im 10- und 18-Somitenstadium nach dem Verlust der *cfl2*-Funktion nicht verändert (Abb. 30A-D). Bei 28 und 36 hpf war die Expressionsdomäne von *isl1* am venösen Pol der *cfl2*-defizienten Tiere jedoch deutlich vergrößert (Abb. 30E-H). Diese Expressionsanalysen machen deutlich, dass Cofilin 2 für die Limitierung der *isl1*-Transkription am venösen Pol nach dem 18-Somitenstadium benötigt wird.

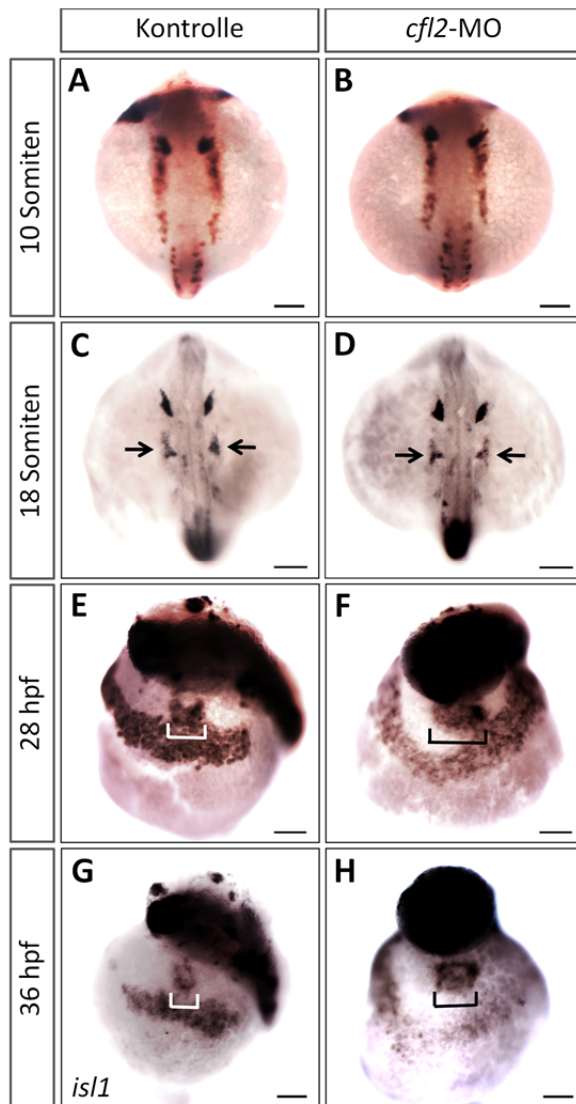


Abbildung 30. Expansion von *is/1*-exprimierenden Zellen am venösen Pol der *cfl2*-Morphanten.

(A-H) Expressionsanalyse von *is/1* mittels *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen zu den angegebenen Stadien. Im 10- und 18-Somitenstadium war die *is/1*-Expression der *cfl2*-Morphanten (B, D) vergleichbar mit der der Kontrollembryonen (A, C). Bei 28 und 36 hpf wurde eine vergrößerte *is/1*-Expressionsdomäne in *cfl2*-Morphanten (F, H) im Vergleich zu den Kontrollembryonen (E, G) detektiert. (A-D) dorsale Ansicht, der Kopf ist nach oben orientiert; (E-H) ventral-laterale Ansicht. Eckige Klammern in E-H und Pfeile in C und D markieren die kardiale Region. Maßstab: 0,1 mm.

2.1.16. Der Verlust der *is/1*-Funktion kompensiert den Überschuss an atrialen Kardiomyozyten in *cfl2*-Morphanten

Um weiterhin zu zeigen, dass Cofilin 2 die atriale Kardiomyozytenzahl durch die negative Kontrolle der *is/1*-Expression am venösen Pol begrenzt, wurde ein Doppel-*Knockdown* von *cfl2* und *is/1* durchgeführt. Zur Quantifizierung der Kardiomyozyten wurde erneut die doppelt-transgene Linie *Tg(my/7:EGFP-HsHRAS)^{s883}; Tg(-5.1my/7:nDsRed2)^{f2}* eingesetzt, die einer immunchemischen Doppelfärbung mit Antikörpern gegen DsRed und AMHC unterzogen wurden. Es ist bereits bekannt, dass der Verlust der *is/1*-Funktion zu einem

verkürzten Atrium im Zebrabärblingembryo führt, wobei die ventrikuläre Kardiomyozytenzahl unverändert bleibt (de Pater *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse konnten hier reproduziert werden, indem im Atrium der *isl1*-Morphanten 99 ± 8 und im Ventrikel 171 ± 7 Zellen bei 50 hpf quantifiziert wurden (Abb. 31B, E). Die Inaktivierung beider Gene, *cfl2* und *isl1*, resultierte in der Reduktion sowohl der atrialen (15 %) als auch der ventrikulären Zellzahl (29 %; Abb. 31D. Beim Vergleich der Kardiomyozytenzahlen der *cfl2*-defizienten Embryonen mit denen der *cfl2-isl1*-Doppel-Morphanten wurde eine 35 %-ige Reduktion der atrialen Zellzahl in den co-injizierten Embryonen festgestellt, jedoch kein signifikanter Unterschied in der ventrikulären Zellzahl. Die 50 hpf alten Doppel-Morphanten wiesen im Atrium 100 ± 6 und im Ventrikel 122 ± 13 Kardiomyozyten auf (Abb. 31E; Kardiomyozytenzahlen der Kontrollembryonen: 117 ± 5 im Atrium, 172 ± 5 im Ventrikel; Kardiomyozytenzahlen der *cfl2*-Morphanten: 154 ± 12 im Atrium, 121 ± 5 im Ventrikel). Diese Daten demonstrieren, dass der *Knockdown* von *isl1* den Überschuss an atrialen Kardiomyozyten in *cfl2*-Morphanten kompensiert, jedoch keine Auswirkungen auf die ventrikuläre Kardiomyozytenzahl hat.

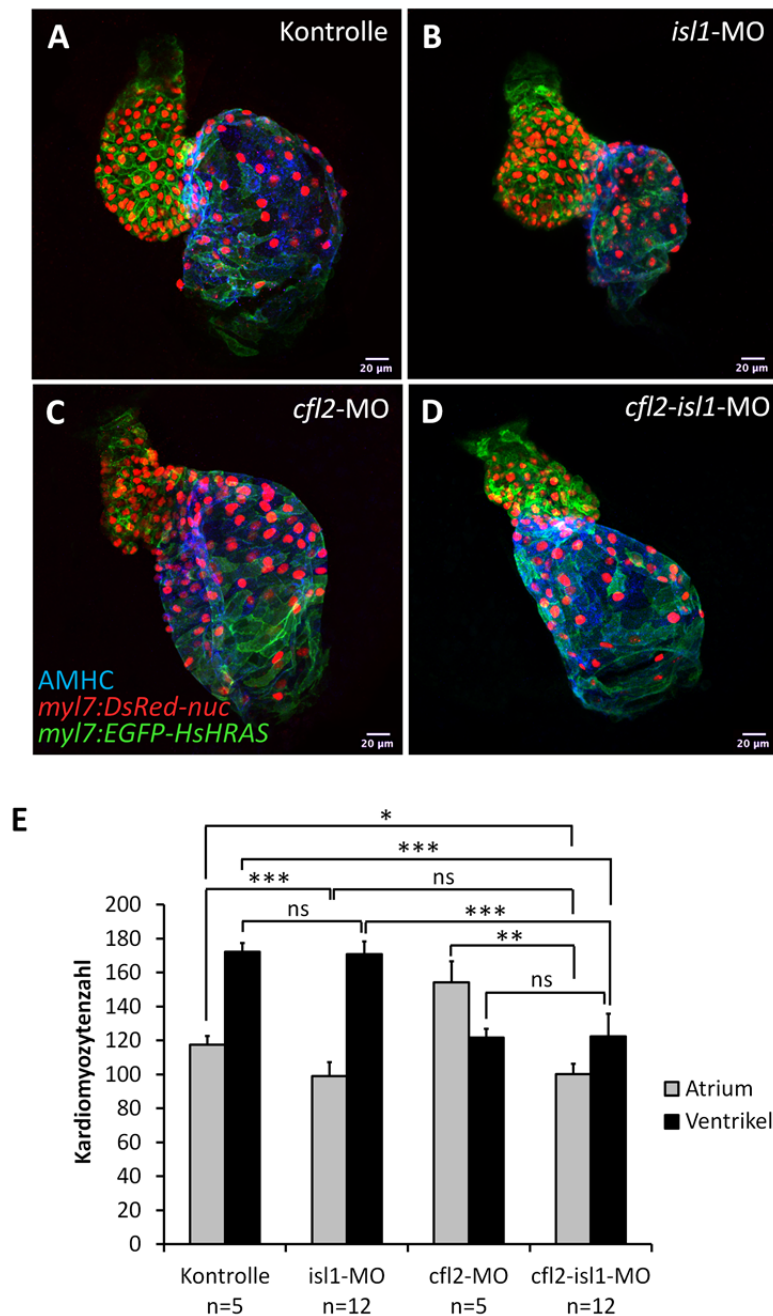


Abbildung 31. Der *Knockdown* von *isl1* kompensiert den Überschuss an atrialen Kardiomyozyten in *cfl2*-Morphanten.

(A-D) Konfokale Aufnahmen von *Tg(myI7:EGFP-HsHRAS)^{s883}; Tg(-5.1myI7:nDsRed2)^{f2}* Embryonen, die bei 50 hpf einer immunchemischen Doppelfärbung mit Antikörpern gegen DsRed und AMHC unterzogen wurden. Der *Knockdown* von *isl1* hatte keinen Effekt auf den Ventrikel, wohingegen das Atrium signifikant verkürzt war (B). Im Vergleich zu den Kontrollherzen (A) wiesen *cfl2*-Morphanten ein vergrößertes Atrium und verkürzten Ventrikel auf (C). Der Doppel-*Knockdown* von *cfl2* und *isl1* hatte eine Reduktion der atrialen und ventrikulären Kardiomyozytenzahl zur Folge (D). (E) Grafische Darstellung der Quantifizierungsergebnisse. ns: nicht signifikant, $p_{\text{Kontrolle-isl1}}=0,2635$; $p_{\text{cfl2-isl1/cfl2}}=0,7582$; * $p=0,0244$; *** $p_{\text{Kontrolle-isl1/cfl2}}=0,0009$; *** $p_{\text{Kontrolle-isl1}}=0,0002$; ** $p=0,0012$. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.1.17. Überexpressionsstudien von *cfl2* während der Herzentwicklung

Um den Effekt der *cfl2*-Überexpression auf die Herzmorphogenese im Zebrafärblingembryo zu studieren, wurde *cfl2*-mRNA mit einem Poly(A)-Schwanz und einer FLAG-HA-Sequenz generiert (siehe 5.1.6.). Mittels Western Blot-Analyse wurde die Translation der injizierten *cfl2*-mRNA verifiziert. Dabei konnte das Cofilin 2-FLAG-HA-Fusionsprotein mit Hilfe des anti-HA-Antikörpers detektiert werden (Abb. 32D). Die Injektion von 20 pg *cfl2*-mRNA in das Einzellstadium von *Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}; Tg(-5.1myl7:nDsRed2)^{f2}* Embryonen ergab eine partielle Phänokopie der Herzen von *cfl2*-defizienten Embryonen (Abb. 32C; 20E). Der kardiale Überexpressionsphänotyp ließ sich durch eine anormale Zellmorphologie, gestörte Schleifenbildung und eine reduzierte Kardiomyozytenzahl im Ventrikel beschreiben (Abb. 32C). In den RNA-injizierten Embryonen wurde eine 23 %-ige Reduktion der ventrikulären Zellzahl bei 50 hpf detektiert (Kontrolle: 170±6; RNA-injizierte Embryonen: 131±22), während die atriale Kardiomyozytenzahl im Vergleich zu den Kontrollembryonen keinen signifikanten Unterschied aufwies (Kontrolle: 114±8; RNA-injizierte Embryonen: 111±19; Abb. 32E). Demnach zeigen diese Daten, dass die Überexpression von *cfl2* einen ähnlichen Effekt auf die Kardiogenese im Zebrafärbling hat wie der *cfl2*-Knockdown.

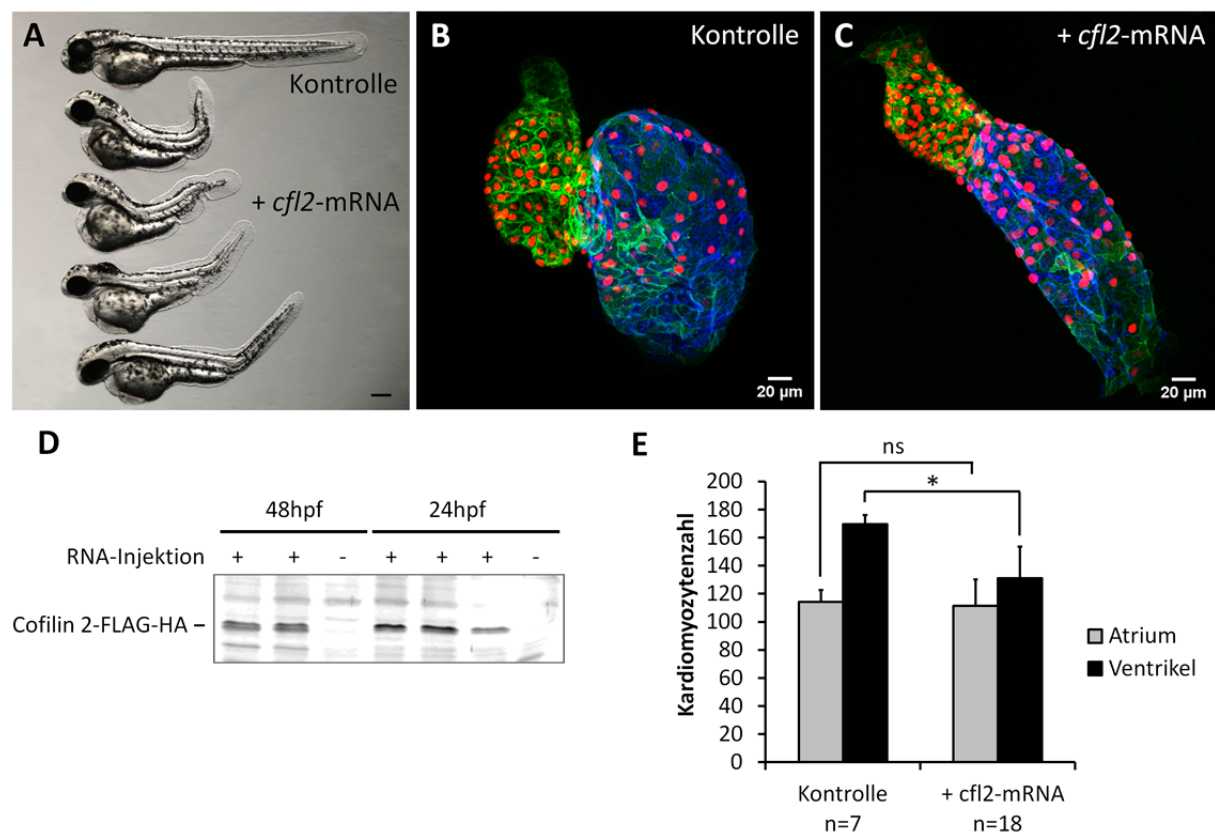
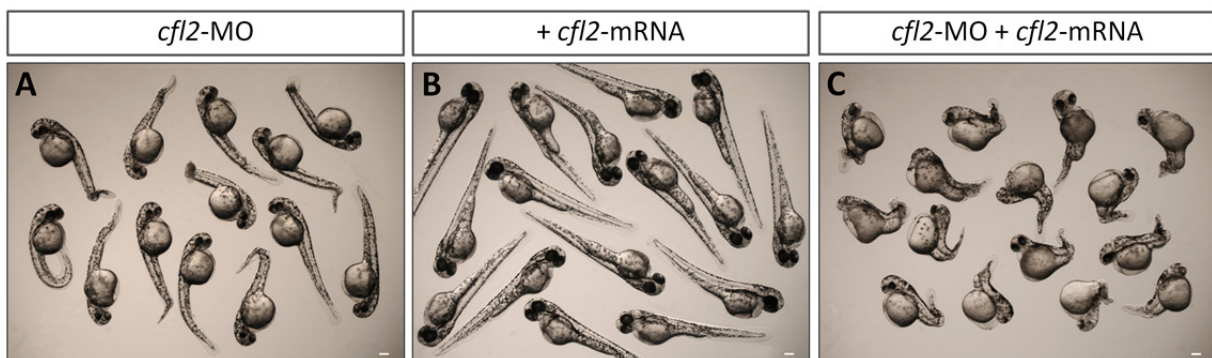


Abbildung 32. Effekt der *cfl2*-Überexpression auf die Herzentwicklung.

(A) Laterale Ansicht von *cfl2*-mRNA-injizierten Embryonen im direkten Vergleich mit einem Kontrollemryo bei 50 hpf. Maßstab: 0,1 mm. (B, C) Konfokale Aufnahmen von *Tg(myf7:EGFP-HsHRAS)^{s883}*; *Tg(-5.1myf7:nDsRed2)^{f2}* Embryonen, die einer immunchemischen Doppelfärbung mit Antikörpern gegen DsRed und AMHC bei 50 hpf unterzogen wurden. Die Überexpression von *cfl2* resultierte in einer reduzierten Anzahl an ventrikulären Kardiomyozyten und einer unveränderten Kardiomyozytenzahl im Atrium (C) gegenüber den Kontrollembrionen (B). (D) Mittels einer Western Blot-Analyse konnte das Fusionsprotein Cofilin 2-FLAG-HA durch einen anti-HA-Antikörper in *cfl2*-mRNA-injizierten Embryonen bei 24 und 48 hpf detektiert werden, jedoch nicht in unbehandelten Embryonen. (E) Grafische Darstellung der Quantifizierungsergebnisse. ns: nicht signifikant, $p=0,8741$; * $p=0,0458$. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

Des Weiteren sollte geprüft werden, ob der Verlust der Cofilin 2-Funktion durch die Injektion der *cfl2*-mRNA kompensiert werden kann. Die Co-Injektion des *cfl2*-Morpholinos zusammen mit der *cfl2*-mRNA erzielte keine „Rettung“ (engl.: *rescue*) der *cfl2*-Morphanten. Verglichen mit *cfl2*-Morpholino- bzw. *cfl2*-mRNA-injizierten Embryonen zeigten die co-injizierten Embryonen deutlich stärkere Defekte in der Gesamtmorphologie (Abb. 33).

**Abbildung 33. Die Injektion der *cfl2*-mRNA erzielte keine Rettung der *cfl2*-Morphanten.**

(A-C) Lichtmikroskopische Aufnahmen von Embryonen bei 50 hpf. Die Co-Injektion des *cfl2*-ATG-Morpholinos und der *cfl2*-mRNA (C) führte zu stärkeren Defekten als diese nach den Einzelinjektionen (A, B) zu beobachten war. Maßstab: 0.1 mm.

2.1.18. Der *Knockdown* und die Überexpression von *cfl2* beeinträchtigen die Organisation der Aktinfilamente

Des Weiteren wurden die Auswirkungen des *Knockdowns* und der Überexpression von *cfl2* auf das Aktinzytoskelett analysiert. Dafür ist vor allem die F-Aktin-reiche Skelettmuskulatur gut geeignet. Die Rhodamin-Phalloidin-Färbung zeigte eine hochstrukturierte Anordnung der Aktinfilamente in der Schwanzmuskulatur von 50 hpf alten Kontrollembrionen (Abb. 34A). Im Gegensatz dazu war sowohl bei den *cfl2*-Morphanten als auch den RNA-injizierten Embryonen eine irreguläre Anordnung des F-Aktins in den Skelettmuskeln zu beobachten. Zudem ließ sich feststellen, dass weder ein reduziertes noch ein erhöhtes *cfl2*-

Expressionsniveau zur kompletten Depolymerisation des Aktins führte (Abb. 34B, C). Diese Beobachtungen führen zu der Erkenntnis, dass sowohl der *Knockdown* als auch die Überexpression von *cfl2* zu einer gestörten Organisation der Aktinfilamente führen.

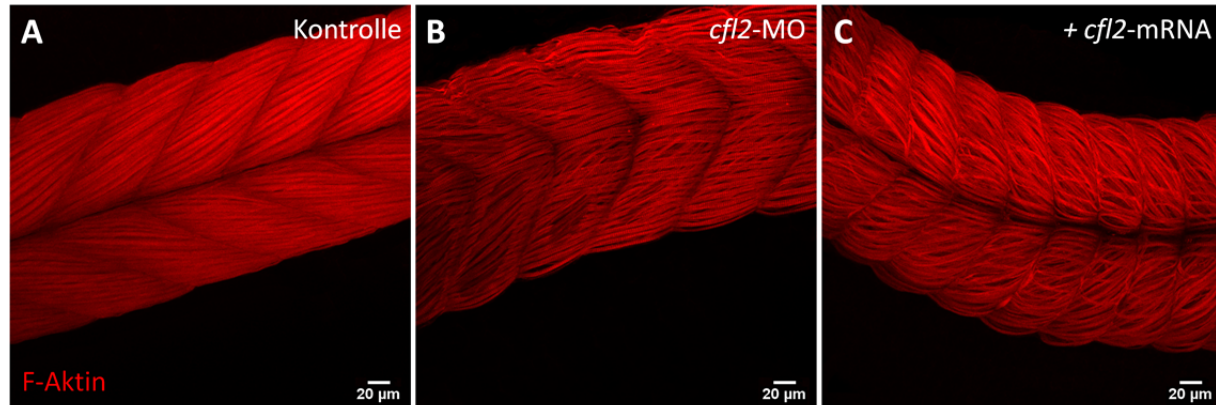


Abbildung 34. Der *Knockdown* und die Überexpression von *cfl2* beeinträchtigen die Organisation von Aktinfilamenten in der Skelettmuskulatur.

(A-C) Konfokale Aufnahmen der Skelettmuskulatur nach einer Rhodamin-Phalloidin-Färbung bei 50 hpf. Im Vergleich zu den Kontrollembryonen (A) war die Organisation der Myozyten in *cfl2*-Morphanten (B) und *cfl2*-mRNA-injizierten Embryonen (C) gestört.

2.2. Cofilin 2 reguliert die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie im Zebrafärbling

2.2.1. Cofilin 2 vermittelt die Lateralität des Herzens

Der kardiale Phänotyp der *cfl2*-Morphanten wird durch eine veränderte Zellmorphologie, anormale Größe der Herzkammern und zudem durch eine gestörte Links-Rechts-Asymmetrie charakterisiert. Der erste morphologisch sichtbare Bruch der bilateralen Symmetrie im Zebrafärblingembryo wird während der Bildung des Herzschlauchs sichtbar. Dieser als *Cardiac Jogging* bezeichnete morphogenetische Prozess verlagert den venösen Pol des Herzschlauchs auf die linke Seite, während der arterielle Pol an der embryonalen Mittellinie bleibt. Am zweiten Tag der Entwicklung (50 hpf) lag der venöse Pol in nahezu allen unbehandelten (97 %) und mit Standard-Kontrollmorpholino injizierten Embryonen (89 %) auf der linken Körperseite (Abb. 35A, E). Nur in seltenen Fällen war der venöse Pol rechts (2 % der unbehandelten und 10 % der Kontrollembryonen) oder an der embryonalen Mittellinie (1 % der unbehandelten und der Kontrollembryonen) lokalisiert. *Cfl2*-Morphanten zeichneten sich dagegen durch eine Randomisierung der Herzlokalisierung aus (Abb. 35B-D). Nur 50 % der *cfl2*-ATG-Morphanten wiesen das Atrium auf der linken Seite auf, während es in 18 % auf der rechten Seite und in 32 % der Morphanten an der Mittellinie platziert war.

Die Injektion des *cfl2*-Spl-Morpholinos resultierte in einer ähnlichen prozentualen Verteilung von Embryonen mit seitenspezifischer Lokalisation des venösen Pols. 47 % der *cfl2*-Spl-Morphanten zeigten eine linksseitige, 39 % eine rechtsseitige und 14 % eine mittige Lokalisation des Atriums (Abb. 35E).

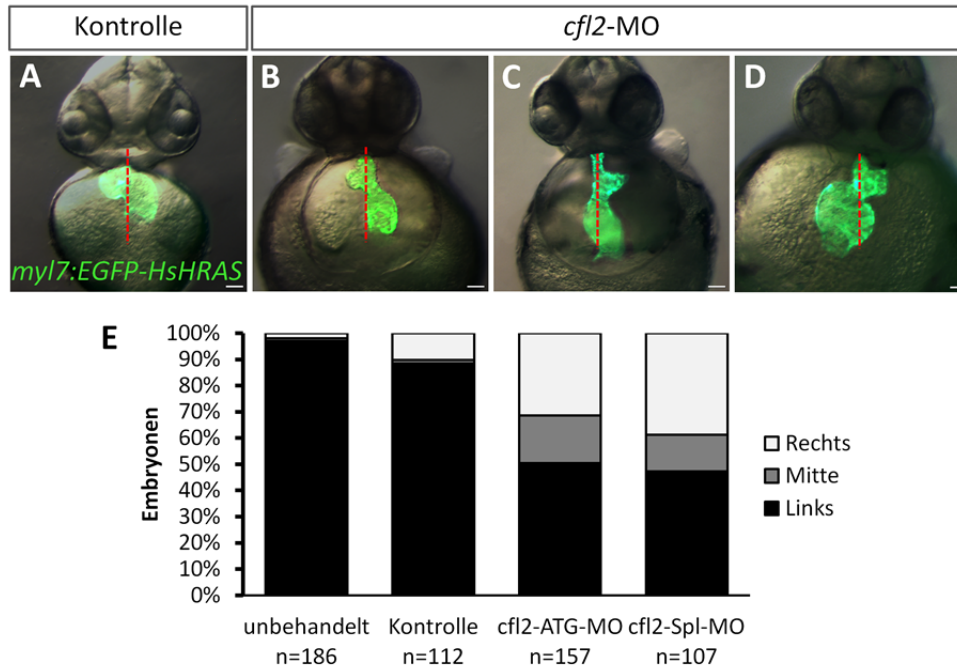


Abbildung 35. *Cfl2*-Morphanten weisen Defekte in der Links-Rechts-Herzasymmetrie auf.

(A-D) Ventrale Ansicht von *Tg(myl:EGFP-HsHRAS)⁵⁸⁸³* Embryonen bei 50 hpf. In Kontrollembryonen war das Atrium auf der linken Seite des Körpers lokalisiert (A). In *cfl2*-Morphanten war das Atrium auf der linken (B), auf der rechten Seite (D) oder in der Mitte (C) platziert. Die rote, gestrichelte Markierung stellt die Mittellinie der Embryonen dar. Maßstab: 0,1 mm. (E) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit linksseitiger, mittiger und rechtsseitiger Lokalisation des Atriums. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.2.2. Cofilin 2 steuert die Links-Rechts-Asymmetrie der viszerale Organe

Zur Überprüfung, ob der *Knockdown* von *cfl2* neben der Links-Rechts-Asymmetrie des Herzens auch die der endodermalen Organen beeinträchtigt, wurde die Entwicklung der Leber und des Darms anhand der Expression des endodermalen Markers *foxa1* analysiert. *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen zeigten die Leber und das Darmrohr aller Kontrollembryonen auf der linken Körperseite (Abb. 36A, E). Im Gegensatz dazu befanden sich diese viszerale Organe nur bei 40 % der *cfl2*-Morphanten auf der linken, bei 27 % auf der rechten Seite und waren bei 33 % entlang der Mittellinie ausgerichtet (Abb. 36B-E). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in *cfl2*-defizienten Embryonen die Links-Rechts-Asymmetrie des Herzens sowie der anderen Organe gestört ist.

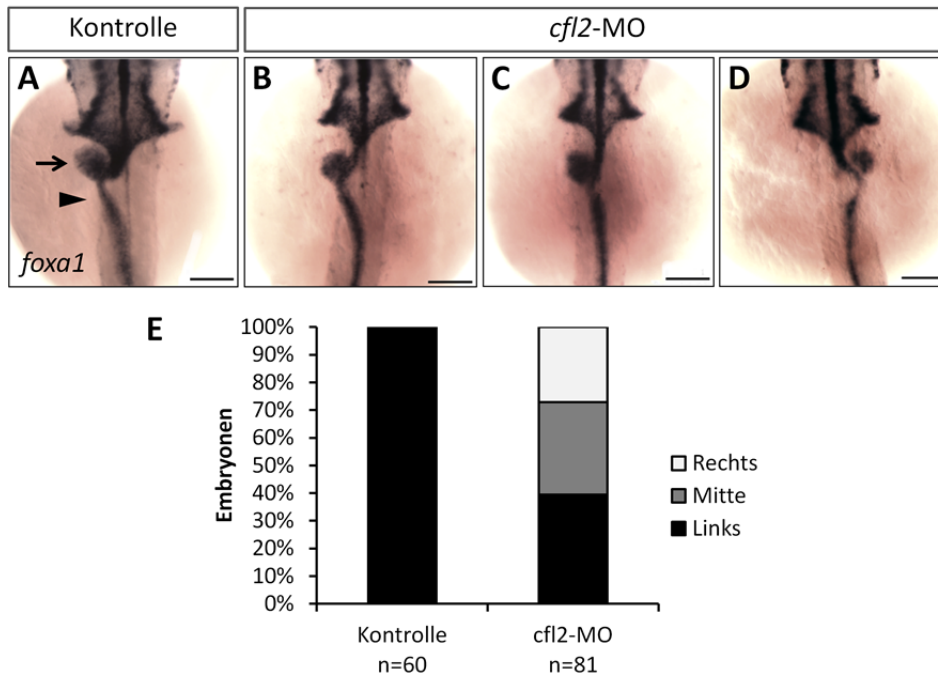


Abbildung 36. *Cfl2*-Morphanten weisen eine aberrante Links-Rechts-Asymmetrie der viszerale Organe auf.

(A-D) Dorsale Ansicht der *foxa1*-Expression bei 45 hpf nach einer *Whole Mount in situ*-Hybridisierung. In Kontrollembryonen waren die Leber (Pfeil in A) und der Darm (Pfeilspitze in A) auf der linken Seite des Körpers platziert. Demgegenüber waren diese endodermalen Organe in *cfl2*-Morphanten linksseitig (B), mittig (C) oder rechtsseitig (D) lokalisiert. Der Kopf ist nach oben orientiert. Maßstab: 0,1 mm. (E) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit linksseitiger, mittiger und rechtsseitiger Lokalisation endodermaler Organe. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.2.3. Die asymmetrische *spaw*-Expression steht unter dem Einfluss der *cfl2*-Funktion

Zur Aufklärung der Ursache für die Randomisierung der embryonalen Links-Rechts-Achse nach dem *cfl2*-Knockdown, wurde die Expression des ersten asymmetrischen Markers *spaw* untersucht. Hierzu wurden *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen im 20-Somitenstadium durchgeführt. Die Expressionsanalysen zeigten die *spaw*-Expression im linken lateralen Plattenmesoderm (LPM) aller Kontrollembryonen (Abb. 37A, E). *Cfl2*-ATG-Morphanten wiesen dagegen eine randomisierte Expression von *spaw* auf (Abb. 37B-E). Dabei wurden bei 41 % der *cfl2*-ATG-Morphanten eine linksseitige, bei 23 % eine rechtsseitige und bei 36 % eine bilaterale *spaw*-Expression im LPM dokumentiert. Eine ähnliche prozentuale Verteilung von Embryonen mit seitenspezifischer *spaw*-Expression wurde nach der *cfl2*-Spl-Morpholino-Injektion beobachtet. Bei 35 % der *cfl2*-Spl-Morphanten wurde *spaw* im linken, bei 31 % im rechten LPM und bei 34 % bilateral exprimiert (Abb. 37E). Diese Expressionsstudie zeigt, dass die Funktion von Cofilin 2 für die asymmetrische Expression von *spaw* benötigt wird.

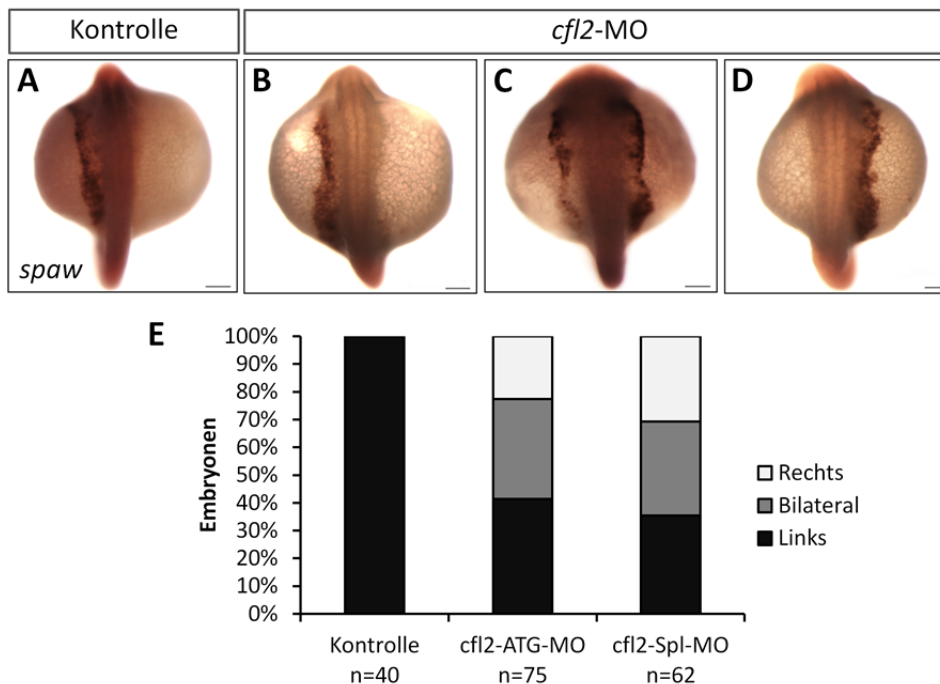


Abbildung 37. *Cfl2*-Morphanten weisen eine randomisierte *spaw*-Expression auf.

(A-D) Dorsale Ansicht der *spaw*-Expression im 20-Somitenstadium nach einer *Whole Mount in situ*-Hybridisierung. Die *spaw*-Expression war bei den Kontrollembryonen auf das linke LPM begrenzt (A). *Cfl2*-Morphanten zeigten dagegen eine linksseitige (B), rechtsseitige (D) oder bilaterale (C) Expression von *spaw*. Der Kopf ist nach oben orientiert. Maßstab: 0,1 mm. (E) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit links, bilateral und rechts exprimierten *spaw*-Transkripten. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

Da sowohl *cfl2*-ATG- als auch *cfl2*-Spl-Morpholino denselben Effekt auf die embryonale Lateralität erzielten, wurde in folgenden Experimenten auf die Unterscheidung zwischen *cfl2*-ATG- und *cfl2*-Spl-Morphanten verzichtet. Auch in diesem Kapitel werden diese unter dem Terminus „*cfl2*-Morphanten“ zusammengefasst.

2.2.4. *Cfl2* wird in den DFCs und im Kupfferschen Vesikel exprimiert

Das Kupffersche Vesikel (KV) reguliert den frühen Links-Rechts-Spezifizierungsprozess im Zebrafisch (Essner *et al.*, 2005). Daher sollte zunächst geklärt werden, ob *cfl2* im KV und in seinen Vorläuferzellen, den DFCs (engl.: *dorsal forerunner cells*), exprimiert wird. Dies kann durch die Prüfung der Co-Lokalisation von *cfl2* und *sox17* erreicht werden. *Sox17* ist ein Marker für endodermale Vorläuferzellen, DFCs und KV (Alexander und Stainier, 1999; Oteiza *et al.*, 2008). Die transgene Linie *Tg(sox17:GFP)^{s870}* wurde bei 60 % Epibolie und im 6-Somitenstadium für *Whole Mount in situ*-Hybridisierungen mit einer spezifischen *cfl2*-Sonde eingesetzt. Der *cfl2*-Detektion schloss sich die GFP-Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von *sox17*-exprimierenden Zellen an. Die daraus resultierende, überlappende

Expression von *cfl2* und *sox17* demonstriert, dass *cfl2* sowohl in DFCs während der Gastrulation (Abb. 38A-C) als auch im KV zu Beginn der Segmentierungsperiode exprimiert wird (Abb. 38D-F).

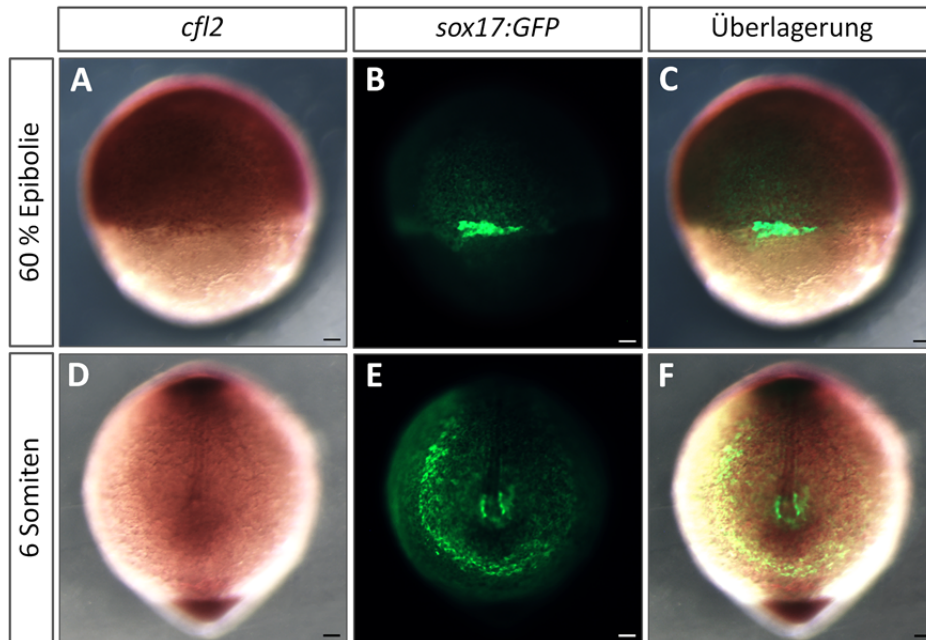


Abbildung 38. *Cfl2* wird in DFCs und im KV exprimiert.

(A-F) Eine Expressionsanalyse von *sox17* und *cfl2* in *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen bei 60 % Epibolie (A-C) und im 6-Somitenstadium (D-F). *Cfl2*-Transkripte wurden mittels *Whole Mount in situ*-Hybridisierung bei 60 % Epibolie (A) und im 6-Somitenstadium (D) detektiert. Eine GFP-Immunfluoreszenzfärbung visualisierte die *sox17*-Expression in denselben Stadien (B, E). Die Co-Lokalisation von *sox17* und *cfl2* ist in den DFCs (C) und im KV (F) gezeigt. (A-C) Dorsale Ansicht, der animale Pol ist nach oben orientiert; (D-F) posteriore Ansicht, die dorsale Seite ist nach oben orientiert. Maßstab: 0,1 mm.

2.2.5. Cofilin 2 steuert zellautonom die Etablierung der embryonalen Lateralität

Um die Autonomie der *cfl2*-Funktion bei der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie zu klären, wurde die Expression von *cfl2* spezifisch in DFCs inhibiert ohne seine Funktion in den restlichen, embryonalen Zellen zu stören. Die Co-Injektion des *cfl2*-Morpholinos zusammen mit Rhodamin-Dextran in das Einzellstadium ermöglichte die Beobachtung der Morpholinoverteilung durch den gesamten Zebrafish-Embryo (Abb. 39A-C). Die Injektion des *cfl2*-Morpholinos in den Dotter der Blastula (256-1000-Zellstadium; 2,5-3 hpf) blockierte die Expression von *cfl2* nur in den DFCs und der Dotterzelle (Amack und Yost, 2004; siehe 5.4.2.; Abb. 39D-F). Die DFC-spezifische Verteilung des Standard-Kontrollmorpholinos (Ktr) hatte keinen Einfluss auf die Determinierung der Links-Rechts-Herzasymmetrie (Abb. 39G). Bei 95 % dieser *Ktr*_{DFC}-Embryonen war der venöse Pol auf der linken, bei 4 % auf der rechten

Seite und bei 1 % in der Mitte lokalisiert (Abb. 39K). Der DFC-spezifische *Knockdown* von *clf2* resultierte dagegen in der Randomisierung der Herzlokalisierung (Abb. 39H-J). Die normale linksseitige Lokalisation des Atriums wurde nur bei 61 % der *clf2_{DFC}*-Morphanten beobachtet, während in 23 % eine rechtsseitige und in 16 % eine Mittellinien-Lokalisation vorlag (Abb. 39K). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass die *clf2*-Funktion in der Dotterzelle für die Steuerung der embryonalen Lateralität benötigt wird, erfolgte die Injektion des *clf2*-Morpholinos in den Dotter bei 4 hpf. Die Inaktivierung von *clf2* ausschließlich in der Dotterzelle zeigte keinen Effekt auf die Lokalisation des Herzens. Bei 97 % der Embryonen drehte sich das Atrium zur linken, bei 2 % zur rechten Seite und bei 1 % blieb der venöse Pol in der Mitte (Abb. 39K). Der DFC-spezifische *Knockdown* demonstriert die zellautonome Funktion von Cofilin 2 in den DFCs während der Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie.

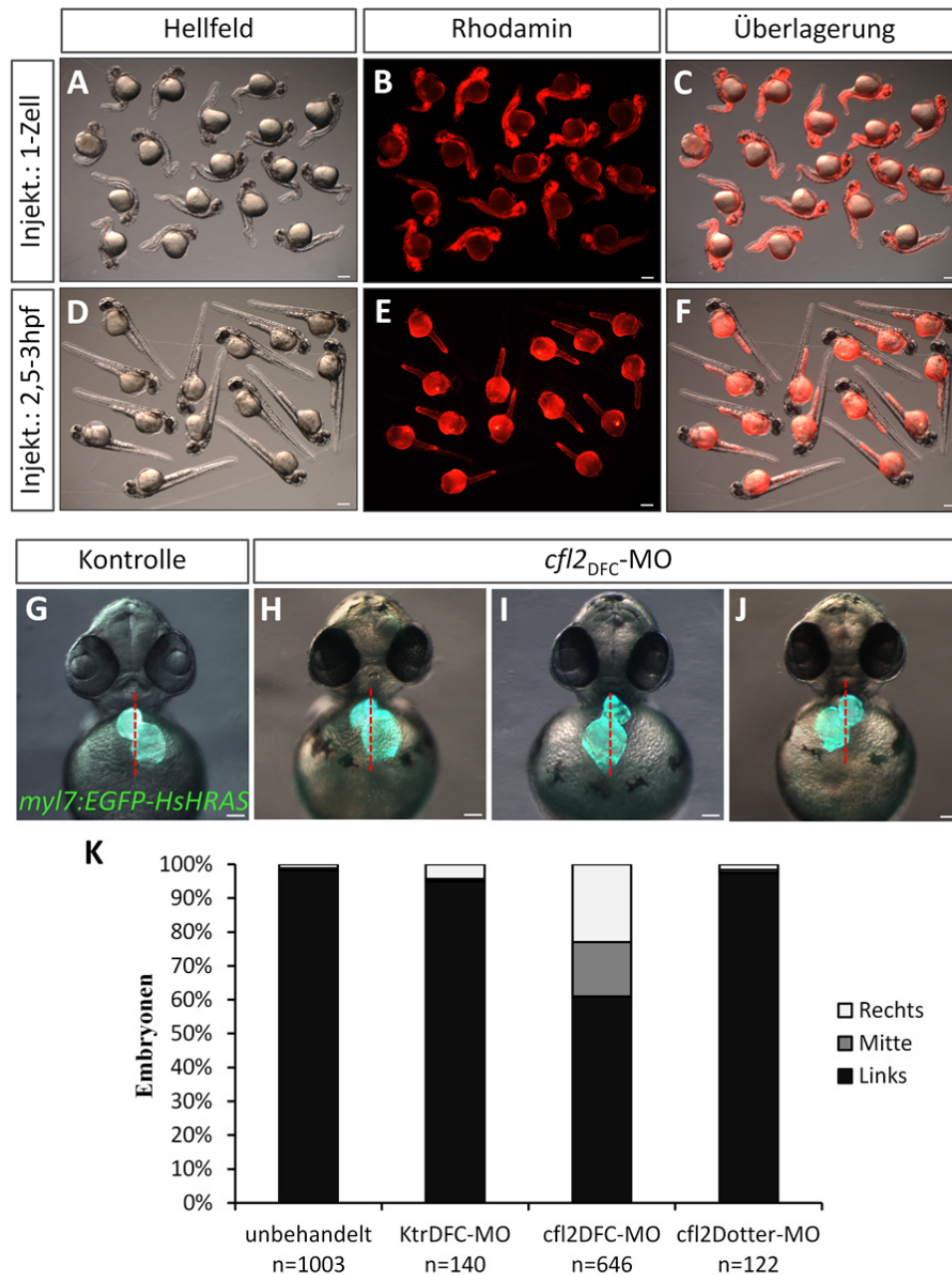


Abbildung 39. Cofilin 2 reguliert zellautonom die Etablierung der Links-Rechts-Asymmetrie.

(A-C) Durch die Co-Injektion des *cfl2*-Morpholinos mit Rhodamin-Dextran in das Einzellstadium wurden diese durch den gesamten Embryo verteilt. (D-F) Morpholino-Injektion zwischen 2,5 und 3 hpf inhibiert die *cfl2*-Expression nur im Dotter und in DFCs. (G-J) Ventrale Ansicht von *Tg(myI7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen bei 48 hpf. (H-J) Randomisierte Herzlokalisierung nach dem DFC-spezifischen *cfl2*-Knockdown im Vergleich zur linksseitigen Lage des Atriums in Kontrollembryonen (G). Die rote, gestrichelte Markierung stellt die Mittellinie der Embryonen dar. Maßstab: 0,1 mm. (K) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit linksseitiger, mittiger und rechtsseitiger Herzlokalisierung. Ktr_{DFC}-MO: Standard-Kontrollmorpholino in DFCs; *cfl2*_{DFC}-MO: *cfl2*-Morpholino in DFCs; *cfl2*_{Dotter}-MO: *cfl2*-Morpholino ausschließlich im Dotter. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.2.6. Cofilin 2 kontrolliert die Entwicklung des Kupfferschen Vesikels

Die irreguläre Expression von *spaw* in *cfl2*-Morphanten (Abb. 37) deutet auf ein dysfunktionales KV hin, das für die asymmetrische Genexpression im Zebrabärblingembryo benötigt wird (Essner *et al.*, 2005). Aufgrund dessen sollte im Folgenden der Einfluss des *cfl2*-*Knockdowns* auf die Entwicklung des KV untersucht werden. Hierfür wurde der Durchmesser des KV im 10-Somitenstadium mittels der Software ImageJ ermittelt. Die Messung ergab eine signifikante Reduktion der KV-Größe infolge der *cfl2*-Defizienz (Abb. 40B). Der KV-Durchmesser der Kontrollembryonen lag bei $71,9 \pm 8,4 \mu\text{m}$ und war bei den *cfl2*-Morphanten auf $24,5 \pm 7,0 \mu\text{m}$ reduziert (Abb. 40C). Um nachzuweisen, dass die geringere Größe des KV von *cfl2*-defizienten Embryonen auf eine reduzierte Anzahl der KV-Zellen zurückzuführen ist, wurden diese in *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen im 10-Somitenstadium quantifiziert. Die Quantifizierung konnte diese Annahme bestätigen, da im Kontrollvesikel 49 ± 3 *sox17*-positive Zellen und im KV *cfl2*-defizienter Embryonen lediglich 15 ± 7 *sox17*-exprimierende Zellen gefunden wurden (Abb. 40D). Zur eingehenden Charakterisierung des KV-Phänotyps nach dem Verlust der *cfl2*-Funktion, wurden die Zilien mit Hilfe eines Antikörpers gegen das acetylierte Tubulin im 8-Somitenstadium visualisiert. Übereinstimmend mit der reduzierten Zellzahl des KV von *cfl2*-defizienten Embryonen war dessen Anzahl an Zilien im gleichen Ausmaß reduziert (Abb. 40F). Die Kontrollembryonen zeigten 46 ± 6 Zilien pro KV, während es in den *cfl2*-Morphanten lediglich 15 ± 5 Zilien innerhalb eines KV waren (Abb. 40G). Schließlich wurde auch die Länge der Zilien ermittelt. Die Messung ergab eine Reduktion der Zilienlänge in *cfl2*-Morphanten. Die Länge der Zilien von Kontrollembryonen betrug $4,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$, während diese in *cfl2*-Morphanten auf $3,0 \pm 0,6 \mu\text{m}$ reduziert war (Abb. 40H). Zusammengefasst lässt sich das KV *cfl2*-defizienter Embryonen durch eine verminderte Größe sowie eine reduzierte Anzahl und Länge der Zilien charakterisieren.

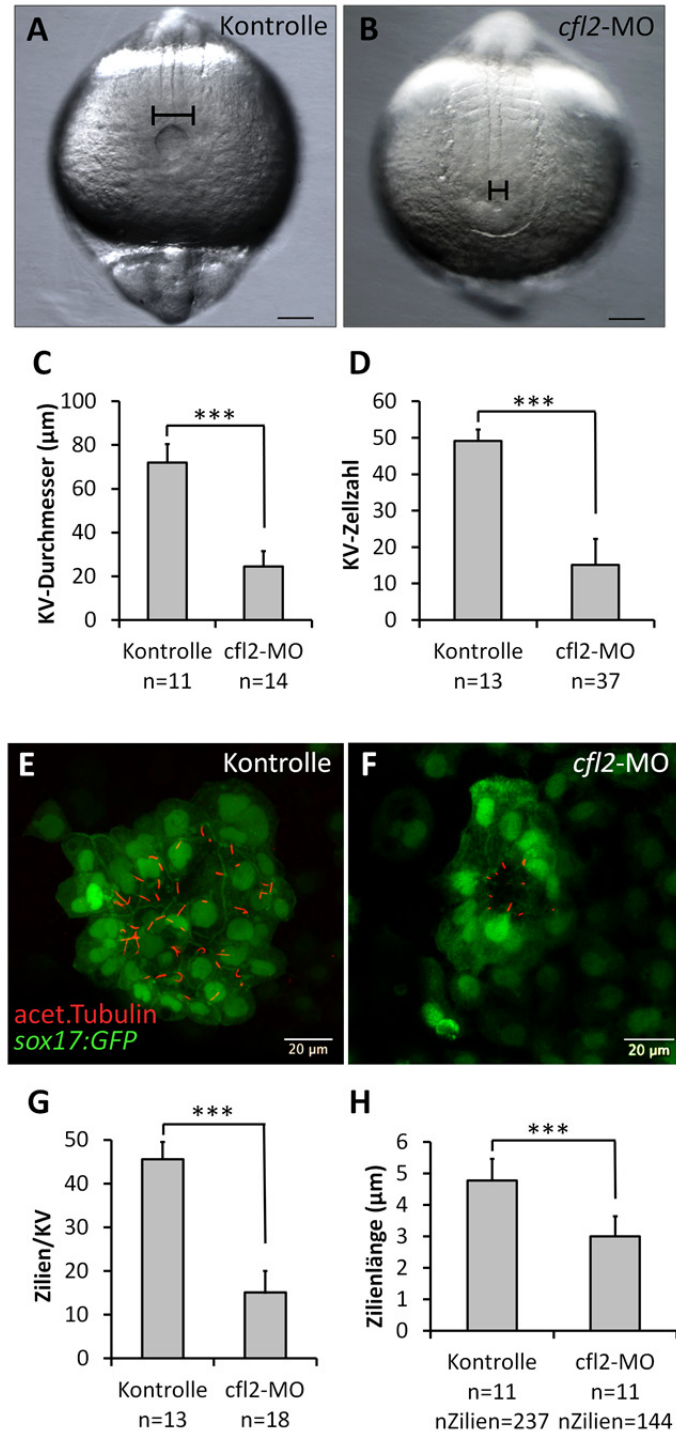


Abbildung 40. Die Entwicklung des Kupfferschen Vesikels ist in *cfl2*-Morphanten beeinträchtigt.

(A, B) Posteriore Ansicht der Embryonen im 10-Somitenstadium. *Cfl2*-Morphanten entwickelten ein kleines KV (B) im Vergleich zu den Kontrollembrionen (A). Die dorsale Seite ist nach oben orientiert. Maßstab: 0,1 mm. (C) Messungen des KV-Durchmessers von *cfl2*-Morphanten und Kontrollembrionen. (D) Quantifizierung der Zellen im KV von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Kontrollembrionen und *cfl2*-Morphanten. (E, F) Konfokale Aufnahmen von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Kupfferschen Vesikeln im 8-Somitenstadium nach der Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-acetylierten Tubulin-Antikörper. *Cfl2*-Morphanten (F) zeigten eine reduzierte Anzahl und Länge der Zilien im Vergleich zu Kontrollembrionen (E). (G) Quantifizierung der Zilien pro KV von *cfl2*-Morphanten und Kontrollembrionen. (H) Messung der Zilienlänge im KV von *cfl2*-Morphanten und Kontrollembrionen. *** $p < 0,0001$. n=Anzahl der untersuchten Embryonen; n_{Zilien}=Anzahl der untersuchten Zilien.

2.2.7. Cofilin 2 kontrolliert die Morphologie des Kupfferschen Vesikels

Zur morphologischen Untersuchung von KV *cfl2*-defizienter Embryonen wurde die atypische Protein Kinase C (aPKC) als ein Epithelmarker verwendet, um die apikale Oberfläche der Vesikelzellen zu markieren. Die Immunfluoreszenzfärbung von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen mit einem anti-aPKC-Antikörper (siehe 5.4.5.) zeigte im *Bud*-Stadium eine Akkumulation der apikalen Membranen sowohl in Kontrollembryonen (Abb. 41A) als auch in *cfl2*-Morphanten (Abb. 41D), wobei in letzteren diese aPKC-Ansammlung geringer ausfiel. Zu Beginn der Segmentierungsstadien wiesen die Kontrolltiere ein expandierendes Lumen innerhalb des KV auf (Abb. 41B, C). Die *cfl2*-Morphanten waren zwar auch in der Lage ein Vesikellumen zu formen, dieses zeigte jedoch eine reduzierte Größe und eine irreguläre Morphologie (Abb. 41E, F). Demnach wird die Funktion von Cofilin 2 für eine normale Morphologie des KV benötigt.

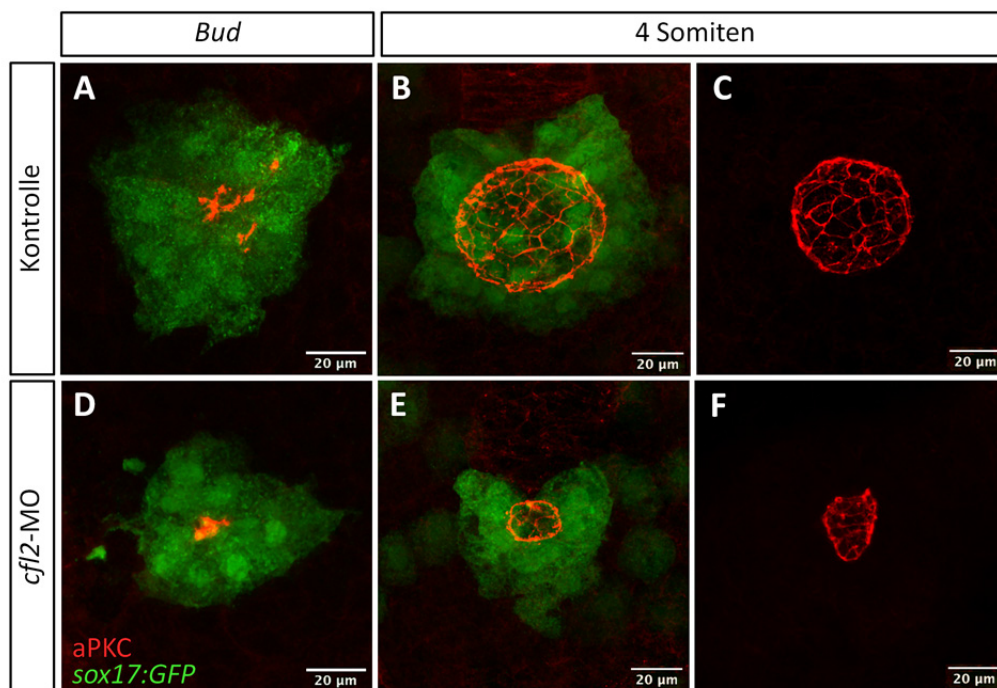


Abbildung 41. *Cfl2*-Morphanten weisen eine anormale Morphologie des Kupfferschen Vesikels auf.

(A-F) Konfokale Aufnahmen von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen, die einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-aPKC-Antikörper zu den angegebenen Stadien unterzogen wurden. Im *Bud*-Stadium zeigten die Kontrollembryonen (A) und *cfl2*-Morphanten (D) eine Akkumulation der apikalen Membranen zu zentralen Cluster. Im 4-Somitenstadium entwickelten die Kontrollembryonen ein KV mit großem Lumen (B, C), während *cfl2*-Morphanten kleine und deformierte KV zeigten (E, F). In B und C bzw. E und F sind zwei repräsentative KV der Kontrollembryonen bzw. der *cfl2*-Morphanten dargestellt; die aPKC-Färbung ist dabei allein oder zusammen mit *sox17:GFP* zu sehen.

2.2.8. Cofilin 2 wird für ein funktionsfähiges Kupffersche Vesikel benötigt

Der *Knockdown* von *cfl2* bringt nach den hier gezeigten Daten kleine und unförmige KV hervor, die zudem weniger und kürzere Zilien aufweisen. Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass der Flüssigkeitsstrom innerhalb dieser KV beeinträchtigt ist. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden fluoreszierende Beads direkt in das KV im 6- bis 10-Somitenstadium injiziert (siehe 5.4.3.). Dies ermöglichte die Beobachtung des Zilienschlags unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die in das Kontrollvesikel injizierten Beads zeigten eine gegen den Uhrzeigersinn gerichtete Rotation (bei dorsaler Ansicht; Abb. 42A). Im Gegensatz dazu war in den *cfl2*-Morphanten nur Brownsche Bewegung ohne eine klare Richtung zu beobachten (Abb. 42B). Somit zeigen diese Untersuchungen, dass die Entwicklung eines funktionsfähigen KV von Cofilin 2 abhängig ist.

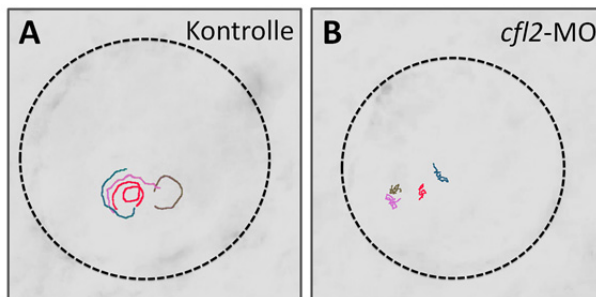


Abbildung 42. Fehlender Flüssigkeitsstrom innerhalb des KV *cfl2*-defizienter Embryonen.

(A-B) Verfolgung einzelner Beads innerhalb eines KV (durch gestrichelten Kreis hervorgehoben). Die fluoreszierenden Beads im KV der *cfl2*-Morphanten (B) zeigten eine stark reduzierte Bewegung im Vergleich zu den rotierenden Beads im KV der Kontrollembryonen (A).

2.2.9. Cofilin 2 kontrolliert die Clusterbildung der DFCs

Um zu prüfen, ob eine defekte DFC-Spezifizierung die reduzierte KV-Größe der *cfl2*-defizienten Embryonen verursacht, wurde die Anzahl der DFCs in *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen bei 60 % Epibolie ermittelt. Diese quantitative Analyse ergab keinen signifikanten Unterschied in der DFC-Zahl zwischen Kontroll- und *cfl2*-defizienten Embryonen. In den Kontrolltieren konnten 27 ± 4 und in den *cfl2*-Morphanten 25 ± 4 DFCs festgestellt werden (Abb. 43A). Die Ursache des dysfunktionalen KV der *cfl2*-Morphanten konnte hingegen durch eine nähere Betrachtung der DFCs während der Epibolie aufgeklärt werden. Die DFCs von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Kontrollembryonen wurden zu Beginn der Gastrulation in der dorsalen Marginalzone des Blastoderms sichtbar. Im Zuge der Epibolie bildeten diese einen kompakten Zellcluster und migrierten zum vegetativen Pol, um in der

Schwanzknospe nach der Initiierung der Segmentierungsperiode das KV zu formen (Abb. 43B-E). In den *cf12*-Morphanten waren die DFCs zwar fähig zum vegetativen Pol zu wandern, doch die Bildung des DFC-Clusters war bei 84 % der *cf12*-defizienten Embryonen gestört (Abb. 43F-I, J, M, N). Im Gegensatz dazu war die Clusterbildung der DFCs lediglich in 9 % der Kontrollembryonen beeinträchtigt (Abb. 43J). Diese Daten zeigen, dass Cofilin 2 für die Clusterbildung der DFCs unabdingbar ist.

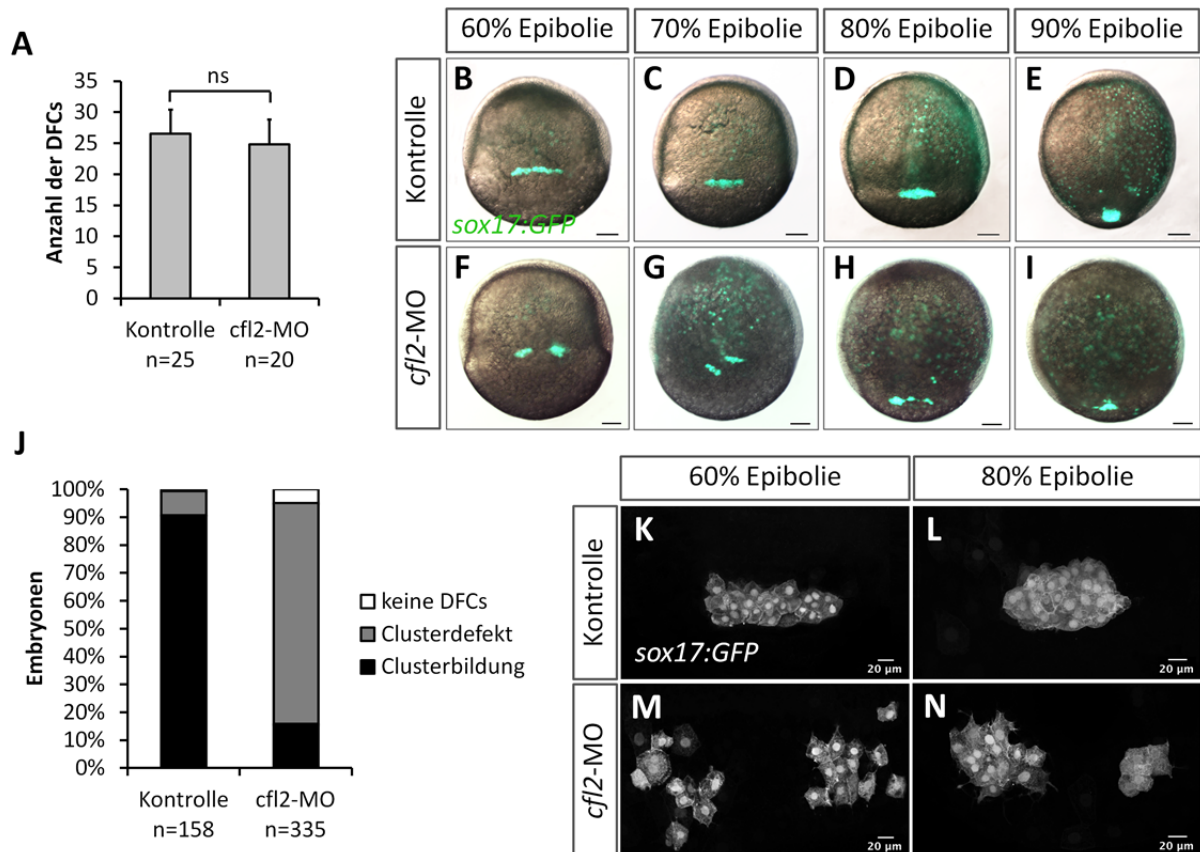


Abbildung 43. Normale DFC-Spezifizierung und defekte DFC-Clusterbildung in *cf12*-Morphanten.

(A) Die Quantifizierung der DFCs in *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der DFC-Zellzahl zwischen Kontrollembryonen und *cf12*-Morphanten bei 60 % Epibolie. ns: nicht signifikant, p=0,0905. (B-I) Dorsale Ansicht von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen zu den angegebenen Zeitpunkten. Die Migration der DFCs ist in Kontrollembryonen (B-E) und in *cf12*-Morphanten (F-I) zu sehen. Der animale Pol ist nach oben orientiert. Maßstab: 0,1 mm. (J) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit normalem und defektem DFC-Cluster sowie mit fehlenden DFCs. n=Anzahl der untersuchten Embryonen. (K-N) Konfokale Aufnahmen von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen bei 60 und 80 % Epibolie. Zu beiden Zeitpunkten war in Kontrollembryonen ein kompakter DFC-Cluster zu beobachten (K, L), während die *cf12*-Morphanten eine gestörte Clusterbildung der DFCs zeigten (M, N).

2.2.10. Separierte DFCs der *cfl2*-Morphanten durchlaufen Apoptose

Da der *Knockdown* von *cfl2* offensichtlich keinen Einfluss auf die Spezifizierung der DFCs ausübt, galt es zu klären, ob eine erhöhte Apoptoserate zur reduzierten Zellzahl des KV von *cfl2*-defizienten Embryonen führt. Hierfür wurden *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen im *Bud*-Stadium mittels der TUNEL-Methode untersucht, die der Detektion apoptotischer Zellen dient (siehe 5.1.9.). Mikroskopische Untersuchungen erbrachten den Nachweis, dass separierte, kleinere DFC-Zellpopulationen der *cfl2*-Morphanten Apoptose durchliefen (Abb. 44B), während in Kontrollembryonen keine apoptotischen DFCs detektierbar waren (Abb. 44A). Diese Beobachtungen führen zu der Erkenntnis, dass Cofilin 2 das Überleben der DFCs gewährleistet.

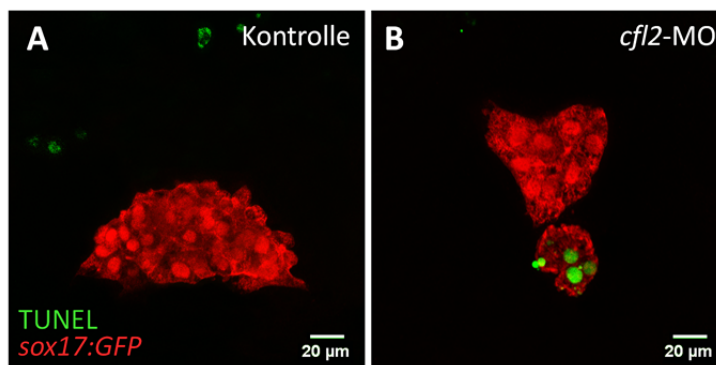


Abbildung 44. Detektion von apoptotischen DFCs in *cfl2*-Morphanten.

(A, B) TUNEL-Untersuchung von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen im *Bud*-Stadium. Im Gegensatz zu den Kontrollembryonen (A) wurden in *cfl2*-Morphanten (B) apoptotische DFCs detektiert.

2.2.11. Cofilin 2 und Integrin- α V1 steuern synergistisch die DFC-Clusterbildung

In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass Integrin- α V1 für die Clusterbildung der DFCs essentiell ist (Ablooglu *et al.*, 2010). Zur Beantwortung der Frage, ob eine funktionelle Interaktion zwischen Integrin- α V1 und Cofilin 2 besteht, wurde ein Morpholino-vermittelter Doppel-*Knockdown* von *cfl2* und *integrin- α V1* (*intaV1*) durchgeführt (siehe 5.4.2). Hierfür wurde die übliche Dosis der beiden Morpholinos um die Hälfte reduziert, so dass die Einzelinjektion eines der beiden Morpholinos keinen Phänotyp hervorbrachte. Die Injektion von 4,5 ng *cfl2*-Morpholino bzw. 0,4 ng *intaV1*-Morpholino in *Tg(myf7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen hatte keinen Einfluss auf die Links-Rechts-Herzasymmetrie. In beiden Fällen zeigten 93 % der injizierten Embryonen eine linksseitige, 6 % eine rechtsseitige und 1 % eine mittige Lokalisation des Atriums (Abb. 45D). Die Co-Injektion beider Morpholinos, *cfl2* und

intaV1, resultierte in einem deutlich höheren Anteil an Embryonen mit anormaler Herzlokalisierung (Abb. 45A-C), während die Gesamtmorphologie unbeeinflusst blieb (Abb. 45E). In 65 % der co-injizierten Embryonen war das Atrium auf der linken, in 23 % auf der rechten Seite und in 12 % an der Mittellinie lokalisiert (Abb. 45D). Darüber hinaus wurde bei 49 % der *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Doppel-Morphanten eine gestörte Clusterbildung der DFCs beobachtet (Abb. 45G, H). Im Vergleich zu den 93 % der Kontrollembryonen, 90 % der mit 4,5 ng *cfl2*- und 95 % der mit 0,4 ng *intaV1*-Morpholino injizierten Embryonen wiesen lediglich 51 % der *cfl2-intaV1*-Doppel-Morphanten einen kompakten DFC-Cluster auf (Abb. 45F, H). Demnach wirken Cofilin 2 und Integrin- α V1 synergistisch, um die Ausbildung der DFC-Cluster zu gewährleisten.

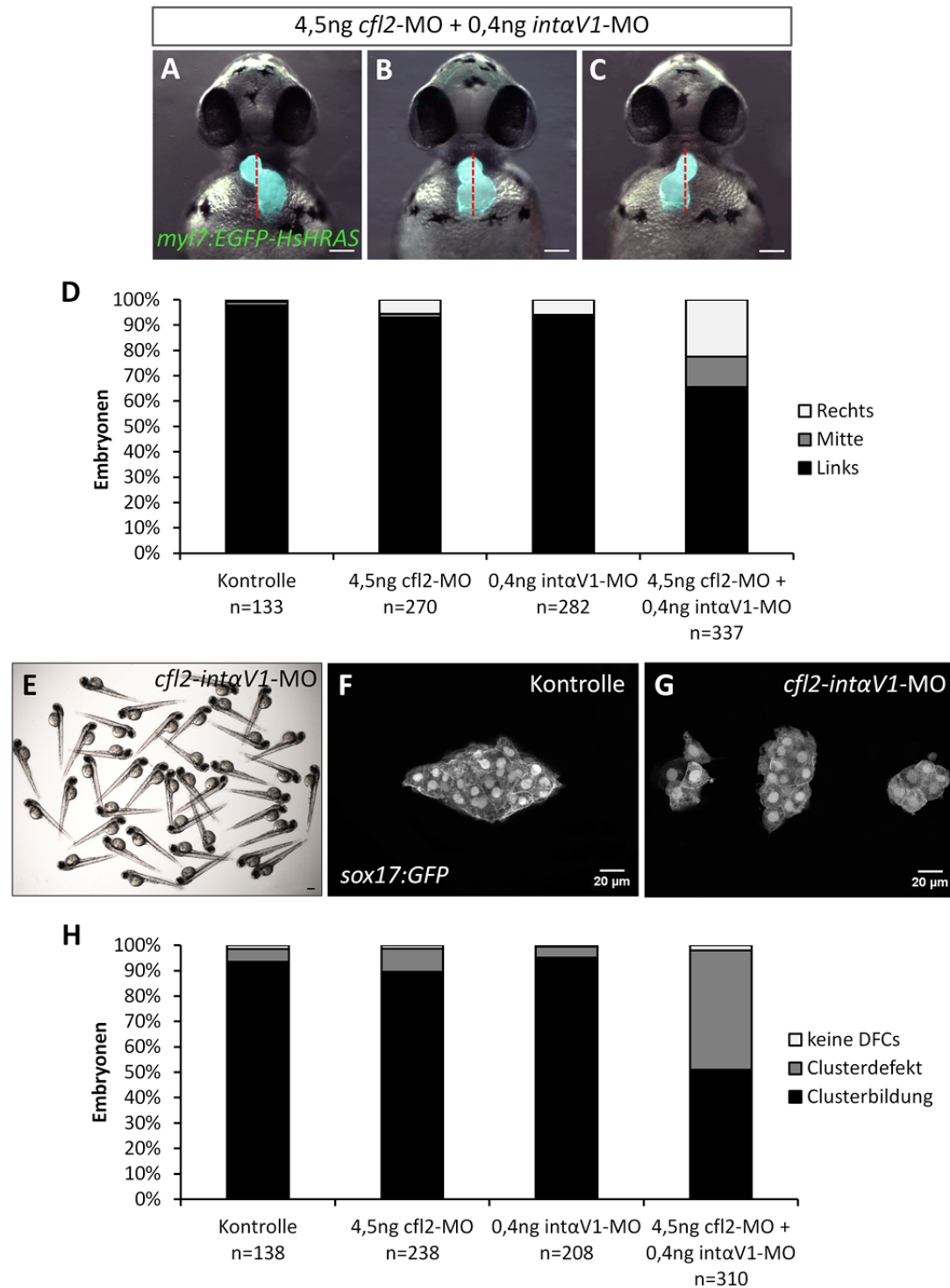


Abbildung 45. Cofilin 2 und Integrin- α V1 interagieren während der Ausbildung der Links-Rechts-Asymmetrie.

(A-C, E) *Tg(myl:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen zeigten nach einer Co-Injektion von 4,5 ng *cfl2*- und 0,4 ng *intaV1*-Morpholino eine randomisierte Herzlokalisierung bei 48 hpf (A-C), während ihre Gesamtmorphologie nicht beeinflusst wurde (E). Maßstab: 0,1 mm. (A-C) Ventrale Ansicht. Die rote, gestrichelte Markierung stellt die Mittellinie der Embryonen dar. (D) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit linksseitiger, mittiger und rechtsseitiger Lokalisation des Atriums. (F, G) Konfokale Aufnahmen von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen bei 80 % Epibolie. In Kontrollembryonen war ein kompakter DFC-Cluster zu beobachten (F), während die *cfl2-intaV1*-Doppel-Morphanten eine gestörte Clusterbildung der DFCs zeigten (G). (H) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit normalem und defektem DFC-Cluster sowie mit fehlenden DFCs. n=Anzahl der untersuchten Embryonen.

2.2.12. Cofilin 2 hat keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin in den DFCs

Eine vorherige Studie demonstriert, dass die Zell-Zellkontakte zwischen den DFCs zusätzlich durch E-Cadherine (epitheliale Cadherine) aufrechterhalten werden (Matsui *et al.*, 2011). Um zu prüfen, ob Cofilin 2 an der Regulation der E-Cadherin-vermittelten DFC-Adhäsionen beteiligt ist, erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit einem pan-Cadherin-Antikörper bei 80 % Epibolie (siehe 5.4.5.). Zu diesem Zeitpunkt wird E-Cadherin durch diesen Antikörper detektiert, da N-Cadherin (neuronales Cadherin) und VE-Cadherin (vaskulär-endotheliales Cadherin) in dieser frühen Entwicklungsphase noch nicht exprimiert werden. Diese immunchemischen Untersuchungen zeigten eine unveränderte Verteilung von E-Cadherin-Molekülen in der Plasmamembran der DFCs nach dem *Knockdown* von *cfl2* (Abb. 46). Demnach übt Cofilin 2 keinen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von E-Cadherin in den DFCs aus.

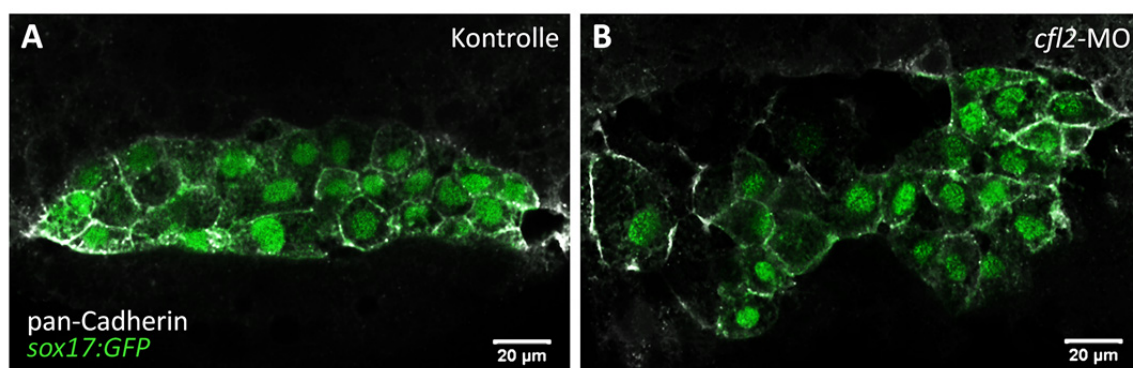


Abbildung 46. Der Knockdown von *cfl2* hat keine Auswirkungen auf die Lokalisation von E-Cadherin in den DFCs.

(A, B) Optische Schnitte durch *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen nach einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem pan-Cadherin-Antikörper bei 80 % Epibolie. Die Verteilung von E-Cadherin-Molekülen in der Plasmamembran der DFCs ist in *cfl2*-Morphanten (B) nicht von den Kontrollembryonen (A) zu unterscheiden.

2.2.13. Die Überexpression von *cfl2* stört die Entwicklung der Links-Rechts-Asymmetrie

Des Weiteren wurde der Effekt der *cfl2*-Überexpression auf die embryonale Lateralität untersucht. Die Injektion von 20 pg *cfl2*-mRNA in das Einzellstadium von *Tg(myf7:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen ergab eine Randomisierung der Herzlokalisierung (Abb. 47A-C). Im Vergleich zu den Kontrollembryonen, von denen 98 % eine linksseitige Lage des venösen Pols zeigten, waren es lediglich 51 % der RNA-injizierten Embryonen, während bei 19 % das

Atrium auf der rechten Seite und bei 30 % in der Mitte lokalisiert war (Abb. 47D). Zudem konnten in 41 % der *cfl2*-mRNA-injizierten *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen defekte DFC-Cluster festgestellt werden (Abb. 47E, G), die hingegen in nur 4 % der Kontrollembryonen beobachtet wurden (Abb. 47E). Die gestörte Clusterbildung der DFCs infolge der *cfl2*-Überexpression führte zu kleinen KV mit reduzierter Anzahl und Länge der Zilien (Abb. 47I). Diese Beobachtung konnte nach einer Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin im 8-Somitenstadium von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen gemacht werden. Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass sowohl der Verlust als auch der Überschuss an Cofilin 2 eine anormale Entwicklung des KV und folglich eine Störung des Situs nach sich zieht.

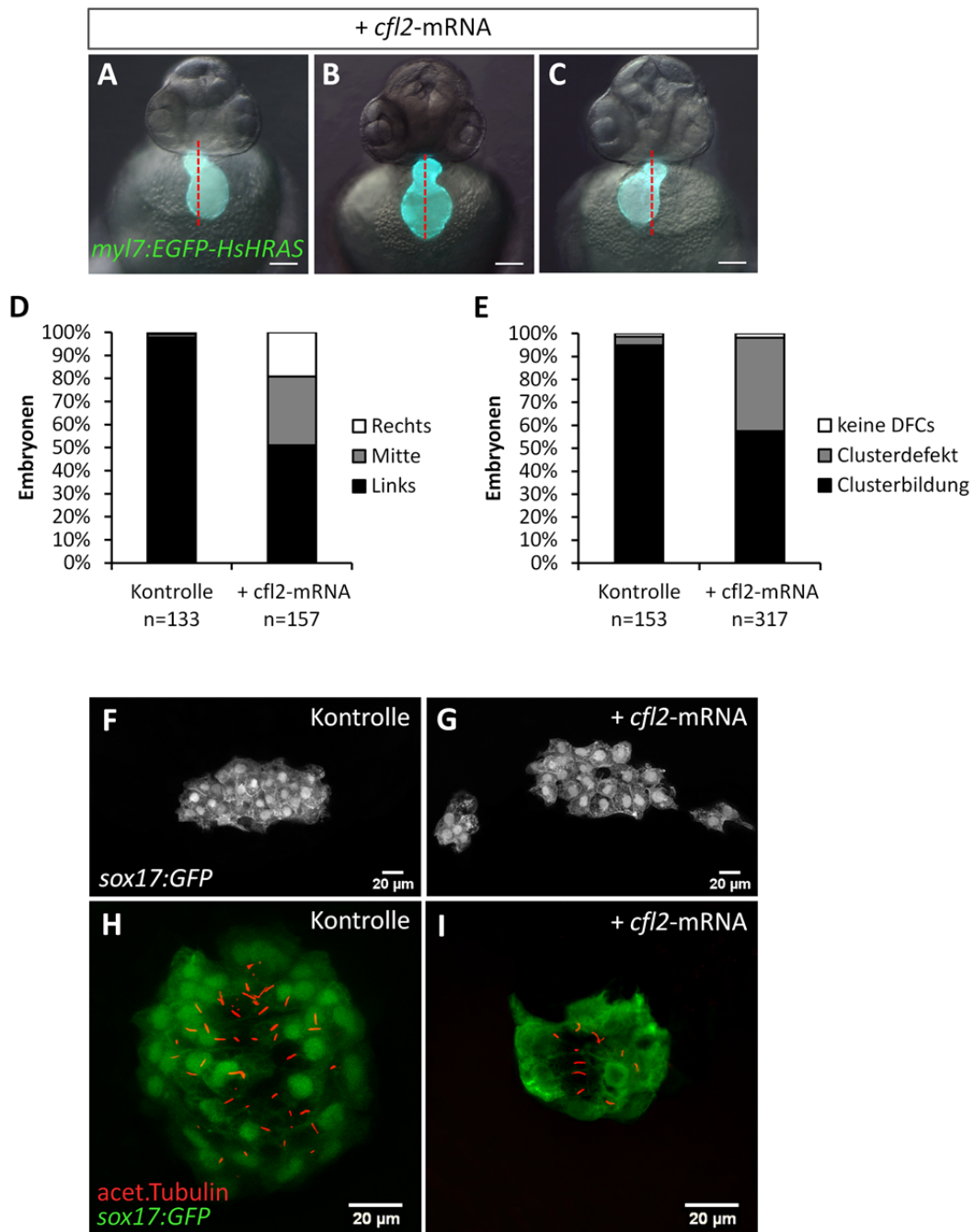


Abbildung 47. *Cfl2*-Überexpression führt zur anormalen Links-Rechts-Asymmetrie.

(A-C) *Tg(myl:EGFP-HsHRAS)^{s883}* Embryonen zeigten nach einer Injektion der *cfl2*-mRNA eine randomisierte Herzlokalisierung bei 48 hpf. Die rote, gestrichelte Markierung stellt die Mittellinie der Embryonen dar. Ventrale Ansicht. Maßstab: 0,1 mm. (D) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit linksseitiger, mittiger und rechtsseitiger Lokalisation des Atriums. (E) Grafische Darstellung der prozentualen Verteilung von Embryonen mit normalem und defektem DFC-Cluster sowie mit fehlenden DFCs. n=Anzahl der untersuchten Embryonen. (F, G) Konfokale Aufnahmen von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen bei 80 % Epibolie. In Kontrollembrionen war ein kompakter DFC-Cluster zu beobachten (F), während die *cfl2*-mRNA-injizierten Embryonen eine gestörte Clusterbildung der DFCs zeigten (G). (H, I) Konfokale Aufnahmen von *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Kupfferschen Vesikeln im 8-Somitenstadium nach einer Immunfluoreszenzfärbung mit anti-acetyliertem Tubulin-Antikörper. Im Vergleich zu den Kontrollembrionen (H) zeigten *cfl2*-mRNA-injizierte Embryonen (I) reduzierte Anzahl und Länge der Zilien.

2.2.14. Der *Knockdown* und die Überexpression von *cfl2* haben keine drastische Veränderung des F-Aktinlevels zur Folge

Um zu untersuchen, wie sich der *Knockdown* und die Überexpression von *cfl2* auf das Aktinzytoskelett innerhalb der DFCs auswirkt, wurde das filamentöse Aktin mittels Rhodamin-Phalloidin in *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen bei 80 % Epibolie visualisiert. Konfokal-mikroskopische Untersuchungen ergaben keine sichtbaren Änderungen des kortikalen F-Aktins nach der Beeinträchtigung des *cfl2*-Levels. Innerhalb des defekten DFC-Clusters der *cfl2*-defizienten (Abb. 48D-F) und *cfl2*-überexprimierenden Embryonen (Abb. 48G-I) konnte keine Akkumulation oder Reduktion der intrazellulären Aktinfilamente im Vergleich zu den Kontrollembryonen (Abb. 48A-C) festgestellt werden.

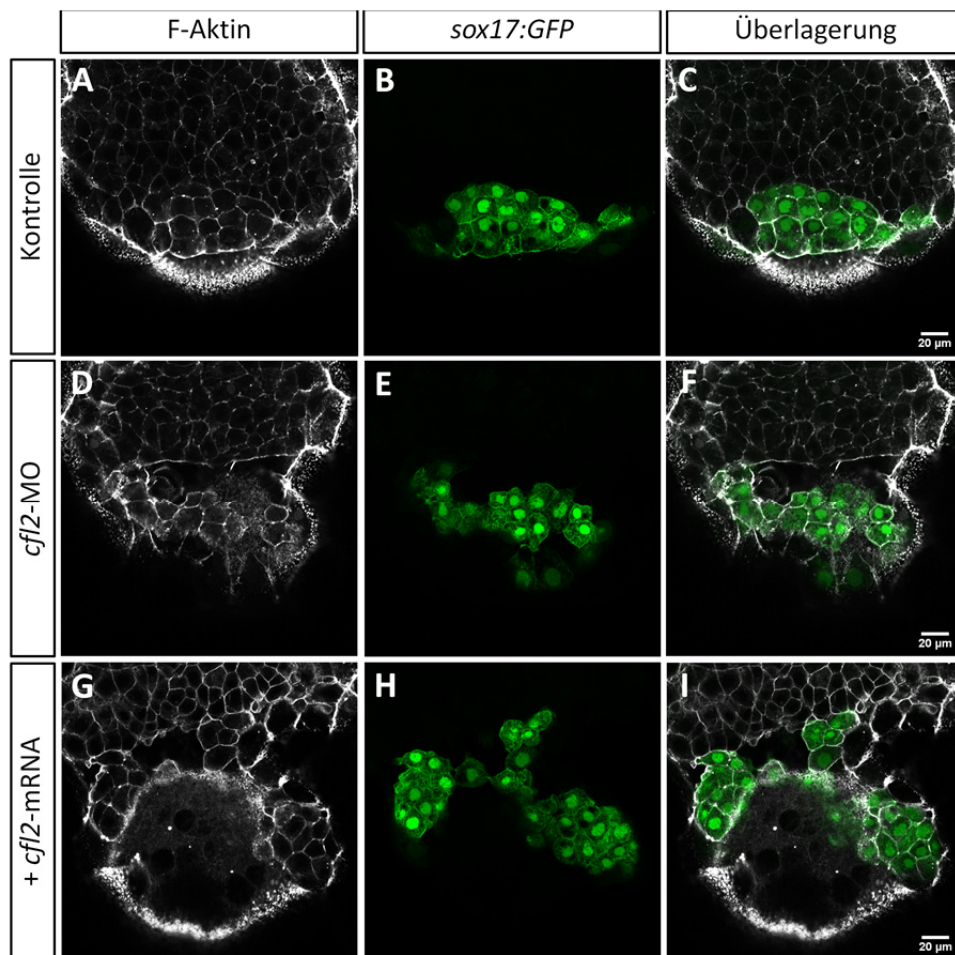


Abbildung 48. Der *Knockdown* und die Überexpression von *cfl2* führen nicht zum Abbau der Aktinfilamente.

(A-I) Optische Schnitte durch *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen nach einer Rhodamin-Phalloidin-Färbung bei 80 % Epibolie. Kortikales F-Aktin innerhalb der DFCs von *cfl2*-defizienten (D-F) und *cfl2*-überexprimierenden Embryonen (G-I) war vergleichbar mit dem der Kontroll-DFCs (A-C).

3. DISKUSSION

3.1. Cofilin 2 und Alcama kontrollieren synergistisch die Herzmorphogenese im Zebrafärbling

Die Zelladhäsion ist ein entscheidender Aspekt morphoregulatorischer Vorgänge. Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurde das Zelladhäsionsmolekül Alcama (engl.: *activated leukocyte cell adhesion molecule a*) als ein essentieller Regulator morphogenetischer Prozesse im Zebrafärblingherzen identifiziert (siehe 1.5.2., Abb. 5), während der zugrunde liegende Regulationsmechanismus weitgehend unbekannt blieb. Die bisher dazu veröffentlichten Daten einer *in vitro*-Studie zeigen, dass die homophile Alcam-Alcam Interaktion durch das Aktinzytoskelett reguliert wird (Nelissen *et al.*, 2000). Die homotypische Adhäsion wird durch die partielle Aktin-Depolymerisation induziert, die in einer erhöhten Mobilität von Alcam in der Zellmembran resultiert. Infolgedessen bilden sich Cluster von Alcam-Molekülen an der Zelloberfläche, die eine Voraussetzung für stabile Interaktionen darstellen (Nelissen *et al.*, 2000). Eine direkte Interaktion zwischen Alcam und Aktin ist jedoch unwahrscheinlich, da mittels Sequenzanalysen keine Anheftungsstellen für das Zytoskelett in der intrazellulären Domäne detektiert werden konnten (Pourquié *et al.*, 1992). Bislang konnte noch nicht geklärt werden, über welche Adapterproteine die Interaktion zwischen Aktin und Alcam vermittelt wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Identifizierung und Charakterisierung neuer Interaktionspartner von Alcama im Zebrafärbling. Zur Detektion von Proteinen, die die Alcama-vermittelte Adhäsion regulieren, wurde hier eine Immunpräzipitation gefolgt von massenspektrometrischen Analysen durchgeführt. Diese Untersuchungen identifizierten unter anderem das Aktin-bindende Protein Cofilin 2 als einen potentiellen Interaktionspartner von Alcama (Abb. 13A). Aufgrund der bereits gezeigten Wechselwirkung zwischen Alcam und dem Aktinzytoskelett (Nelissen *et al.*, 2000) wurde sein Zebrafärbling-Homolog Alcama unter den ermittelten Kandidaten für weitere Analysen selektiert. Die Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 konnte *in vitro* durch Co-Immunpräzipitationen verifiziert werden. Die Validität dieser Interaktionsstudie wurde durch drei unabhängige Wiederholungsexperimente sowie durch die Kontroll-Co-Immunpräzipitationen mit Proteinextrakten belegt, in denen entweder Cofilin-FLAG-HA oder Alcama überexprimiert vorlag (siehe 2.1.1., Abb. 13B). Es blieb bei diesen Experimenten allerdings fraglich, ob es sich dabei um eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 handelt. Die im Vergleich zu dem 5 %-igen Input schwache Bande des rekombinanten Proteins Cofilin 2-FLAG-HA im Western Blot nach einer Co-

Immunpräzipitation deutet auf eine indirekte Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 hin. Obwohl beide Interaktionspartner in überexprimierter Form vorlagen, konnte nur eine geringe Menge von Cofilin 2 präzipitiert werden. Offenbar stellen zwischengeschaltete Proteine die limitierenden Parameter der Co-Immunpräzipitation dar. Allerdings kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesem experimentellen Ansatz die optimalen Interaktionsbedingungen (z.B. pH, Salzgehalt) nicht gefunden wurden.

Dessen ungeachtet konnte die funktionelle Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 im Zuge der *Knockdown*-Studien nachgewiesen werden. Ventrikuläre Kardiomyozyten *cfl2*-defizienter Embryonen zeigten dieselben morphologischen Defekte (siehe 2.1.4., Abb. 18B, C) wie die Kardiomyozyten der *alcama*-Morphanten (Abb. 5B). In beiden Fällen blieb die Reifung dieser Zellen aus, so dass sie keine Änderung der Zellform von schuppenförmig zu kubisch während der kardialen Schleifenbildung durchliefen (Abb. 5D; 19B). Damit kam auch die Entwicklung des kontraktile Apparates in *cfl2*- und *alcama*-Morphanten zum Erliegen. Dies wird durch die Anordnung der zellulären Aktinfilamente ersichtlich, die in schuppenförmigen Kardiomyozyten hauptsächlich auf der basalen Seite lokalisiert waren, während die kubischen Herzmuskelzellen vollständig vom F-Aktin durchzogen waren (Abb. 19A, B). Des Weiteren zeigten die Lokalisationsstudien, dass die Alcama-Moleküle auf die Zell-Zellkontakte im Ventrikel der Kontrollembryonen beschränkt waren (Abb. 19C, C'). Demgegenüber waren diese gleichmäßig in der ventrikulären Kardiomyozytenmembran von *cfl2*-defizienten Embryonen verteilt (Abb. 19D, D'). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die subzelluläre Lokalisation von Alcama in den ventrikulären Kardiomyozyten durch Cofilin 2 reguliert wird. Dabei stellt Cofilin 2 ein Bindeglied zwischen Alcama und Aktin dar. Diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen frühere Untersuchungen von Nelissen *et al.* (2000), die eine Wechselwirkung zwischen Alcama und dem Aktinzytoskelett nachweisen. Weiterhin lässt sich feststellen, dass die gleichmäßige Verteilung der Alcama-Moleküle infolge des *cfl2*-*Knockdowns* denselben Effekt auf die Morphologie der ventrikulären Kardiomyozyten hat wie der Verlust der Alcama-Funktion. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass Cofilin 2 für die stabilen Alcama-Interaktionen benötigt wird, die bei der Reifung der Kardiomyozyten eine entscheidende Rolle spielen. Weitere Studien müssen zeigen, ob Cofilin 2 hierbei die Clusterbildung von Alcama-Molekülen fördert, die für die stabilen adhäsiven Wechselwirkungen bei einer homophilen Interaktion benötigt werden (Nelissen *et al.*, 2000). Es ist davon auszugehen, dass Alcama hauptsächlich homophile Interaktionen während der

Kardiogenese vermittelt, da es von allen Kardiomyozyten im Zebrabärblingembryo exprimiert wird (Abb. 19C).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Cofilin 2 die Lokalisation von Alcama durch das Aktinzytoskelett reguliert um eine korrekte Herzmorphogenese sicherzustellen (Abb. 49).

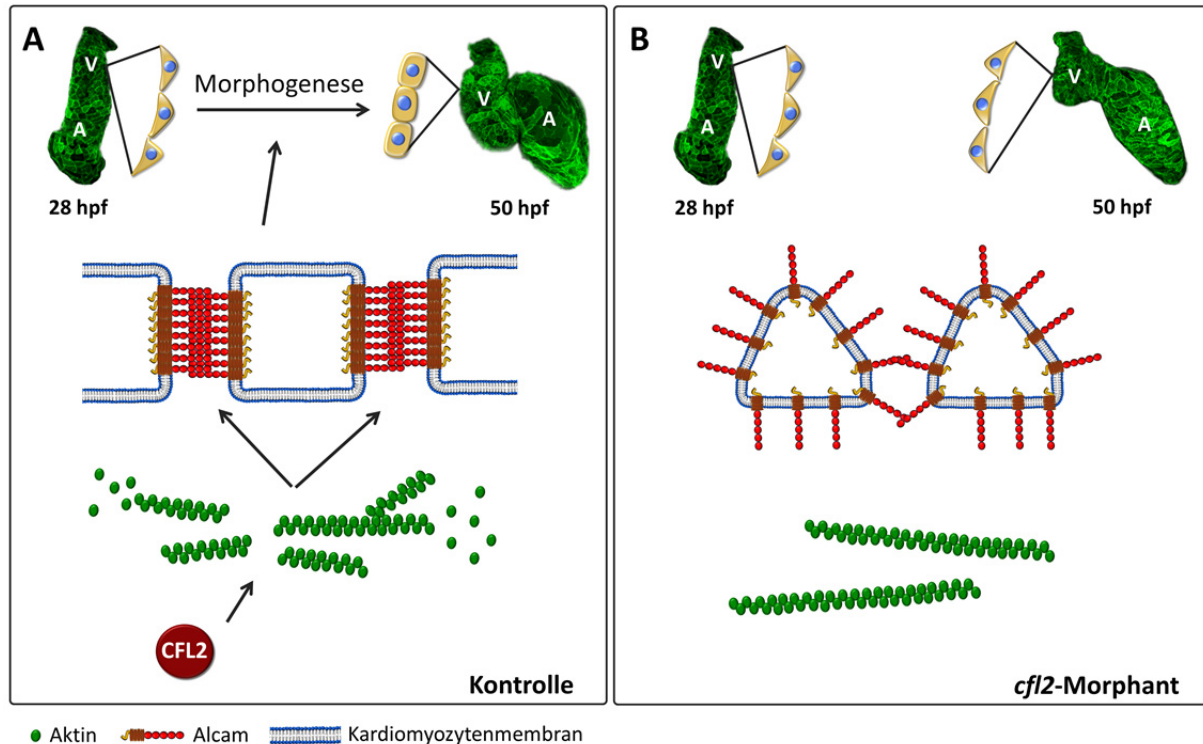


Abbildung 49. Modell zur funktionellen Interaktion zwischen Alcama und Cofilin 2 bei der Regulation der Herzmorphogenese.

(A) Die Cofilin 2-vermittelte Aktindynamik beschränkt die Lokalisation von Alcama-Molekülen auf die Zell-Zellkontakte des Ventrikels (V), die für die Formänderung der Kardiomyozyten von schuppenförmig zu kubisch während der Schleifenbildung benötigt wird. (B) Durch die reduzierte Aktindynamik in den *cf12*-Morphanten bleiben die Alcama-Proteine gleichmäßig in der ventrikulären Kardiomyozytenmembran verteilt. Infolgedessen resultiert eine Störung der kardialen Morphogenese. A: Atrium.

3.2. Cofilin 2 wird im frühen Zebrabärbling- und Mausembryo exprimiert

In der vorliegenden Arbeit durchgeführte Expressionsanalysen von *cf12* in Zebrabärblingembryonen belegen, dass Cofilin 2 in der frühen embryonalen Entwicklung stark exprimiert wird (Abb. 14). Im Rahmen einer zuvor durchgeführten, groß angelegten mRNA-Expressionsstudie wurden *cf12*-Transkripte erst in der Segmentierungsphase der Zebrabärblingembryonen detektiert (Thisse *et al.*, 2004). Diese Daten stehen im Widerspruch zu den hier gewonnenen Erkenntnissen, deren Gültigkeit durch die Verwendung der *Sense*-Sonde belegt werden konnte. Die Kontrollhybridisierung mit der

Sense-Sonde zeigte keine spezifischen Färbungen zellulärer Strukturen (hier nicht gezeigt) und beweist damit die Spezifität der *cfl2*-*Antisense*-Sonde. Zusätzlich wurden *cfl2*-Transkripte mittels der RT-PCR-Analyse im 8-Zellstadium nachgewiesen (Abb. 15A). In der frühen Entwicklungsphase (60 % Epibolie) konnte die Expression von *cfl2* in den DFCs und später (6-Somitenstadium) im KV detektiert werden (Abb. 38). Ferner demonstrierte der DFC-spezifische *Knockdown* von *cfl2* seine zellautonome Funktion während der DFC-Clusterbildung (Abb. 39) und unterstützt die Annahme, dass Cofilin 2 auch für die frühe embryonale Entwicklung unverzichtbar ist.

Im Mausembryo gilt Cofilin 1 als die prominenteste Isoform für die Regulation der Embryonalentwicklung, während Cofilin 2 lediglich für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Muskulatur von Bedeutung zu sein scheint (Agrawal *et al.*, 2012; Bamburg und Bernstein, 2010; Vartiainen *et al.*, 2002). Da bei bisherigen *cfl2*-Analysen die spätere embryonale (ab E9.5) und vor allem die postnatale Entwicklung im Fokus standen, wurde in dieser Arbeit die Expression von *cfl2* auch an den Embryonaltagen E6.5 bis E9.5 mittels der RT-PCR-Analyse nachgewiesen (Abb. 15B). Diese beschreibt zwar nicht das räumliche Expressionsmuster, lenkt aber die Aufmerksamkeit auf die Rolle von Cofilin 2 in frühen Entwicklungsprozessen, die vor der Myogenese stattfinden. Eine im letzten Jahr veröffentlichte Studie dokumentiert den Phänotyp der *cfl2*-Mausmutanten, die erst nach der Geburt sarkomerische Defekte entwickeln (Agrawal *et al.*, 2012). Die unbeeinträchtigte Embryogenese dieser Mäuse lässt sich mit der partiellen Redundanz der ADF/Cofilin-Familienmitglieder erklären. Sowohl Cofilin 1 als auch Cofilin 2 werden in der embryonalen Skelett- und Herzmuskulatur exprimiert. Nach der Geburt sind in der skelettalen Muskulatur aus dieser Proteinfamilie ausschließlich die Transkripte von *cfl2* detektierbar, während Cofilin 1 zusammen mit Cofilin 2 weiterhin im postnatalen Myokard exprimiert wird (Vartiainen *et al.*, 2002). Infolgedessen resultiert die Mutation von *cfl2* einzig in dem Defekt der postnatalen Skelettmuskulatur, während Cofilin 1 den Verlust von Cofilin 2 im Herzen kompensiert. Diese Annahme wurde durch die erhöhte *cfl1*-Expression in kardialen Muskelfasern von *cfl2*-Mausmutanten untermauert (Agrawal *et al.*, 2012). Die Co-Expression beider Isoformen im Myokard minimiert die kardialen Defekte im Falle eines mutierten Cofilin-Gens. Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass Cofilin 2 während der frühen embryonalen Entwicklung sowohl im Zebrafisch als auch in der Maus exprimiert wird.

3.3. Cofilin 2 reguliert die Anzahl der Kardiomyozyten im Zebrabärblingembryo

Neben der Morphologie des Herzens war auch die Anzahl der Kardiomyozyten in zwei Tage alten *cfl2*-Morphanten verändert. Während der Ventrikel eine Reduktion der Kardiomyozytenzahl aufwies, war die Anzahl der atrialen Herzmuskelzellen signifikant erhöht (siehe 2.1.6., Abb. 20). Zur Verifizierung der Spezifität des *cfl2*-Phänotyps wurden zum einen zwei nicht-überlappende Morpholinos (*cfl2*-ATG- und *cfl2*-Spl-Morpholino) injiziert, die denselben Effekt auf die Embryogenese hatten (Abb. 16D, E, 18). Zum anderen resultierten aus der Injektion des Standard-Kontrollmorpholinos keine der für die *cfl2*-Morphanten typischen Defekte, stattdessen waren mit dem Kontrollmorpholino-injizierte Embryonen nicht von unbehandelten Embryonen zu unterscheiden (Abb. 16D, E). Zudem wurden die Funktionalität sowie die Spezifität des *cfl2*-ATG- und *cfl2*-Spl-Morpholinos durch die Western-Blot- (Abb. 16B) und RT-PCR-Analysen (Abb. 16C) belegt. Die Phänotyp-Spezifität wurde weiterhin durch die Behandlung von Zebrabärblingembryonen mit den Aktin-bindenden Inhibitoren Cytochalasin D und Latrunculin B demonstriert, die die Polymerisation des Aktinzytoskeletts inhibieren. Im Gegensatz zu den *cfl2*-Morpholinos übten diese Aktin-Inhibitoren keinen Einfluss auf die Kardiomyozytenzahl aus (Abb. 21). Damit wurde gezeigt, dass die chemische Zerstörung des Aktinzytoskeletts nicht denselben Effekt auf die Kardiogenese hat wie die *cfl2*-Defizienz. Während Cytochalasin D und Latrunculin B im gesamten Embryo auf das Aktinzytoskelett wirken, unterliegen die Aktivität und die Expression von Cofilin 2 einer strengen Kontrolle (siehe 1.7.3.). Zudem haben diese Inhibitoren und Cofilin 2 nicht denselben Effekt auf das F-Aktin, da Cofilin 2 sowohl die Polymerisation als auch die Depolymerisation der Aktinfilamente fördern kann (siehe 1.7.2.). Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass die Morpholino-induzierten Effekte spezifisch für den Verlust der Cofilin 2-Funktion sind.

3.3.1. Cofilin 2 fördert die Differenzierung von Kardiomyozyten am arteriellen Pol

Die aus den quantitativen Analysen ermittelte Reduktion der ventrikulären Kardiomyozytenzahl ab 28 hpf als Folge der *cfl2*-Defizienz ließ sich durch die mRNA-Expressionsstudie von *vmhc* bestätigen (siehe 2.1.8.). Zudem konnte das Entwicklungsstadium bestimmt werden, in dem die phänotypischen Veränderungen des

Ventrikels in *cfl2*-defizienten Embryonen zum ersten Mal sichtbar waren. Die im Vergleich zu den Kontrollembryonen unveränderte *vmhc*-Expression im 15- und 21-Somitenstadium der *cfl2*-Morphanten (Abb. 22A-D) weist darauf hin, dass Cofilin 2 keine Auswirkungen auf die ventrikuläre Entwicklung während der Migration der kardialen Vorläuferzellen und ihrer Fusion zum *Cardiac Cone* hat. Diese Beobachtung lässt sich durch die fehlende *cfl2*-Expression im LPM (laterales Plattenmesoderm) erklären (Abb. 14). Eine reduzierte *vmhc*-Expressionsdomäne ließ sich in *cfl2*-Morphanten erstmals bei 28 hpf feststellen (Abb. 22F), einem Zeitpunkt, an dem die Ausbildung der Herzschleife und des Ausflusstraktes eingeleitet werden. Das Expressionsmuster von *vmhc* ließ zusätzlich erkennen, dass die zum arteriellen Pol rekrutierten Zellen in *cfl2*-Morphanten vollständig fehlten. Frühere Studien demonstrieren, dass aus diesen *vmhc*-exprimierenden SHF- (zweites Herzfeld, engl.: *second heart field*) Zellen, die an den *myl7*-positiven Bereich angrenzen, das Myokardium des distalen Ventrikels und des Ausflusstraktes hervorgeht (Lazic und Scott, 2011; Zhou *et al.*, 2011). Die Verkürzung des Ventrikels in *cfl2*-defizienten Embryonen lässt sich demnach auf einen SHF-Defekt zurückführen, für den zahlreiche mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden können. Dazu zählen eine anormale Proliferation, Spezifizierung, Migration und Differenzierung der SHF-Vorläuferzellen.

Die Untersuchung der Proliferation mittels BrdU-Inkorporation konnte nicht zur Klärung der Ursache dieses SHF-Defektes beitragen. Aus der signifikanten Reduktion proliferierender Kardiomyozyten am arteriellen Pol von *cfl2*-Morphanten (Abb. 28) kann nicht zwangsläufig auf eine defekte Proliferation der ventrikulären Zellen geschlossen werden. Im Fall eines Differenzierungsdefektes blieben die BrdU-positiven Zellen in dem zum arteriellen Pol angrenzenden Bereich negativ für *myl7* und würden somit bei der Quantifizierung nicht erfasst werden, woraus ebenfalls eine signifikante Abnahme proliferierender Kardiomyozyten resultieren würde.

Durch Untersuchungen von *Isl1*, *Nkx2.5* und *Kdrl* (auch als *Flk1* bekannt), den Markern für kardiovaskuläre Vorläuferzellen, konnte ihre Expression am arteriellen Pol auch nach dem Verlust der Cofilin 2-Funktion festgestellt werden (siehe 2.1.9., Abb. 23). Die Expression von *isl1* in den SHF-Vorläuferzellen und deren Inkorporation in den arteriellen Pol wurde in Zebrafischembryonen von Hami *et al.* (2011) nachgewiesen. Aufgrund der Tatsache, dass *isl1* nicht nur in kardialen Vorläuferzellen sondern auch im Gehirn exprimiert wird (Korzh *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1994; Abb. 30), konnte keine eindeutige Grenze zwischen dem

kardialen Bereich und dem umgebenden Gewebe gezogen werden, so dass die Quantifizierung der Isl-positiven Vorläuferzellen am distalen Ende des Ventrikels nicht möglich war. Somit konnte aus der Immundetektion von Isl nur die Existenz der kardialen Vorläuferzellen am arteriellen Pol der *cf/2*-Morphanten festgestellt werden, jedoch keine quantitative Aussage darüber gemacht werden. Der zweite hier untersuchte Transkriptionsfaktor Nkx2.5 ist ein evolutionär konservierter Marker für kardiale Vorläuferzellen des ersten und zweiten Herzfeldes. Dessen Expression in den SHF-Vorläuferzellen am arteriellen Pol der Zebrafischembryonen wurde in einer früheren Studie dokumentiert (Zhou *et al.*, 2011). Der Nachweis von vaskulären Vorläuferzellen erfolgte mit Hilfe des dritten Markers Kdr1, der in solchen mit Isl1 co-exprimiert wird (Moretti *et al.*, 2006). Durch die immunchemische Detektion von Isl, Nkx2.5 und Kdr1 konnte die Präsenz von kardiovaskulären Vorläuferzellen im extra-myokardialen Bereich des arteriellen Pols von *cf/2*-Morphanten belegt werden. Diese Daten deuten daher darauf hin, dass der reduzierte Ventrikel der *cf/2*-Morphanten nicht aus einer defekten Spezifizierung oder einer fehlerhaften Migration von kardiovaskulären Vorläuferzellen resultiert.

Basierend auf der Erkenntnis einer früheren Studie, dass Isl1-positive Vorläuferzellen das Potenzial besitzen in drei kardiovaskulären Zelltypen zu differenzieren (Moretti *et al.*, 2006; Abb. 3), wurde die Transdeterminationshypothese aufgestellt. Hiernach würden *isl1*-exprimierende Vorläuferzellen in *cf/2*-Morphanten vermehrt zu glatten Muskelzellen und/oder Endothelzellen und nur eingeschränkt zu myokardialen Zellen differenzieren. In *cf/2*-defizienten Embryonen konnten jedoch keine Auffälligkeiten der Endothelzellen im Ausflusstrakt der *cf/2*-Morphanten bei 50 hpf festgestellt werden (Abb. 24). Zudem zeigte die glatte Muskulatur des Bulbus Arteriosus eine deutliche Reduktion seiner Größe als Folge der *cf/2*-Defizienz (Abb. 25). Damit widerlegen diese experimentellen Daten die Transdeterminationshypothese.

Eine weitere Theorie geht von einem Differenzierungsdefekt als Ursache für den reduzierten Ventrikel der *cf/2*-defizienten Embryonen aus. Diese Annahme konnte durch die reduzierte Expressionsdomäne von *mef2cb* nach dem Verlust der *cf/2*-Funktion bestätigt werden. Während die Transkripte von *mef2cb* im Ventrikel der *cf/2*-Morphanten detektierbar waren, fehlten diese in den SHF-Zellen am arteriellen Pol (Abb. 26). In früheren Studien wird Mef2cb als ein wichtiger SHF-Regulator beschrieben, dessen Expression für die terminale Differenzierung von Kardiomyozyten am arteriellen Pol des Zebrafischs benötigt wird

(Lazic und Scott, 2011; Hinitz *et al.*, 2012). Lazic und Scott demonstrierten, dass der *Knockdown* von *mef2cb* in einem Verlust der *vmhc*-exprimierenden Zellpopulation am arteriellen Pol resultiert (Lazic und Scott, 2011), der auch hier infolge der *cfl2*-Defizienz festgestellt wurde (Abb. 22). Des Weiteren zeigten die gleichen Autoren eine Reduktion des Bulbus Arteriosus in *mef2cb*-defizienten Zebrafärbryonen, wodurch auf eine weitere Rolle von Mef2cb bei der Entwicklung der glatten Muskelzellen des arteriellen Pols hingedeutet wird. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann der Schluss gezogen werden, dass Cofilin 2 *upstream* von *mef2cb* agiert, um die Differenzierung der SHF-Vorläuferzellen zu ventrikulären Kardiomyozyten sowie zu den glatten Muskelzellen am Ausflusstrakt zu fördern.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der *Knockdown* von *cfl2* keine Auswirkungen auf die Spezifizierung und die Migration der kardiovaskulären Vorläuferzellen hat, stattdessen in einem Verlust der *mef2cb*-Expression in den SHF-Zellen resultiert, der wiederum die Reduktion des Ventrikels und der glatten Muskulatur am arteriellen Pol zur Folge hat.

3.1.2. Cofilin 2 limitiert die Anzahl der Kardiomyozyten am venösen Pol

Der Herzphänotyp der *cfl2*-Morphanten wird neben dem reduzierten Ventrikel auch durch ein vergrößertes Atrium charakterisiert (siehe 2.1.6.). Die erhöhte Kardiomyozytenzahl im Atrium der *cfl2*-Morphanten bei 28 hpf konnte durch die größere *amhc*-Expressionsdomäne verifiziert werden, die im 26-Somitenstadium allerdings noch nicht von der der Kontrollembryonen zu unterscheiden war (Abb. 27). Daraus lässt sich schließen, dass die Zunahme der atrialen Kardiomyozytenzahl und somit der *amhc*-Expression bei den *cfl2*-Morphanten im zeitlichen Rahmen zwischen 22 und 28 hpf erfolgt. Die Frage, ob eine erhöhte Kardiomyozytenzahl im Atrium der *cfl2*-Morphanten auf eine gesteigerte Zellproliferation zurückzuführen ist, konnte mittels BrdU-Inkorporation beantwortet werden. Diese ergab, dass die Anzahl BrdU-positiver Kardiomyozyten am venösen Pol der *cfl2*-Morphanten vergleichbar mit der in Kontrollembryonen war (Abb. 28). Aus der normalen Proliferationsrate des atrialen Myokards lässt sich schließen, dass der *Knockdown* von *cfl2* keinen Einfluss auf die Proliferation myokardialer Zellen hat. Weiterhin ist hier anzumerken, dass im Vergleich zu dem Größenwachstum des Herzens zwischen dem 21-Somitenstadium (*Cardiac Cone*) und 28 hpf (Herzschlauch) die Rate der Proliferation

verhältnismäßig gering ist. Diese Beobachtung unterstützt frühere Forschungsergebnisse, die zeigen, dass das Zebrafischherz weniger durch Zellproliferation als vielmehr durch die Rekrutierung und Differenzierung von myokardialen Vorläuferzellen wächst (de Pater *et al.*, 2009).

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass die Zeitspanne, in der die Kardiomyozytenzahl im Atrium der *cfl2*-Morphanten zunimmt, zeitlich mit dem terminalen Differenzierungsprozess am venösen Pol überlappt, der von der *Isl1*-Funktion abhängig ist (de Pater *et al.*, 2009). Um die Auswirkungen der *cfl2*-Defizienz auf die Expression von *Isl1* sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden *in situ*-Hybridisierungen und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. In beiden Fällen wurde eine Zunahme von *Isl1*-exprimierenden Kardiomyozyten am venösen Pol der *cfl2*-Morphanten bei 28 und 36 hpf dokumentiert (Abb. 29, 30). Weiterhin zeigten die *in situ*-Hybridisierungen eine unveränderte *isl1*-Expression im 10- (bilaterale Herzfelder) und 18-Somitenstadium (kurz vor der kardialen Fusion; Abb. 30B, D). Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass Cofilin 2 die Expression von *isl1* nach der kardialen Fusion beeinflusst, um die Anzahl *Isl1*-positiver Zellen am venösen Pol zu limitieren. Diese Schlussfolgerung wird durch die Resultate des Doppel-*Knockdowns* von *isl1* und *cfl2* unterstützt, der zur selben Kardiomyozytenzahl im Atrium führt wie der *Knockdown* von *isl1* (Abb. 31). Diese Daten illustrieren, dass *cfl2*-Morphanten in Abwesenheit von *Isl1* keinen Überschuss an atrialen Kardiomyozyten generieren und darüber hinaus den Differenzierungsprozess am venösen Pol nicht abschließen. Demzufolge übt Cofilin 2 eine repressive Wirkung auf die Expression von *isl1* aus, um die Vollendung des Differenzierungsprozesses am venösen Pol zu kontrollieren. Die signifikante Zunahme der atrialen Kardiomyozytenzahl in den *cfl2*-Morphanten resultiert somit aus der höheren Anzahl *Isl1*-positiver Zellen am venösen Pol, die aus dem SHF stammen (Witzel *et al.*, 2012) und erst später in einem *Isl1*-abhängigen Prozess dem Herzschlauch zugefügt werden (de Pater *et al.*, 2009). Ein ähnlicher Effekt wurde in einer vorherigen Studie nach dem Verlust des LIM-Domänen Proteins Ajuba im Zebrafisch beobachtet (Witzel *et al.*, 2012). Ajuba wurde in dieser Studie als ein Interaktionspartner von *Isl1* identifiziert, dessen transkriptionelle Aktivität durch Ajuba reprimiert wird. Der *Knockdown* von *ajuba* hat demzufolge eine Expansion der *Isl1*-positiven Zellzahl zur Folge, die mit einer Erhöhung der Kardiomyozytenzahl sowohl am venösen als auch arteriellen Pol einherging (Witzel *et al.*, 2012). Dieser Sachverhalt legt eine Beteiligung

von Ajuba an dem atrialen Phänotyp *cfl2*-defizienter Embryonen nahe. Die Erhöhung der ventrikulären Kardiomyozytenzahl in *ajuba*-Morphanten ließ die Autoren spekulieren, dass Ajuba an der Regulation weiterer Isl-Homologe beteiligt ist, welche in die Zelldifferenzierung am arteriellen Pol involviert sind (Witzel *et al.*, 2012). Anders als im Mausembryo hat der Verlust der Isl1-Funktion im Zebrafärbling keine Auswirkung auf die ventrikuläre Zellzahl (de Pater *et al.*, 2009), wie dies auch hier in *isl1*-Morphanten zu beobachten war (Abb. 31B, E). Aus diesem Grund hat der Verlust der Isl1-Funktion in *cfl2*-Morphanten keinen Effekt auf die Anzahl ventrikulärer Kardiomyozyten (Abb. 31D, E).

Die anormale Anzahl an Isl1-positiven Zellen am venösen Pol der *cfl2*-Morphanten könnte zusätzlich deren reduzierte Herzschlagfrequenz verursachen (Abb. 16F). Diese Annahme basiert auf den Erkenntnissen einer früheren Studie, die zeigt, dass aus *isl1*-exprimierenden Zellen des Mausembryos die Schrittmacherzellen hervorgehen (Sun *et al.*, 2007). Zusätzlich wurde in Zebrafärblingembryonen mit mutiertem *isl1*-Gen eine Bradykardie dokumentiert (de Pater *et al.*, 2009), die auf eine Rolle von Isl1 im Erregungsleitungssystem hindeutet.

Unter Berücksichtigung der in diesem Kapitel diskutierten Studien lässt sich festhalten, dass Cofilin 2 die Anzahl der vom SHF-stammenden Zellen Herzkammer-spezifisch reguliert. Während Cofilin 2 am arteriellen Pol die Differenzierung der ventrikulären Zellen durch die Aktivierung der *mef2cb*-Expression fördert, reguliert es am venösen Pol die Vollendung des Differenzierungsprozesses durch die Limitierung der *isl1*-Expression (Abb. 50). Die gegensätzliche Wirkung von Cofilin 2 auf die Entwicklung beider Herzkammern könnte durch eine unterschiedliche Zusammensetzung der aktiven Regulationsfaktoren an beiden kardialen Enden verursacht sein, die sich auf die Aktivität von Cofilin 2 auswirken. Diese Vermutung wird durch die Lage der beiden Pole im Zebrafärblingembryo unterstützt. Anders als im Mausembryo, bei dem sowohl der arterielle als auch der venöse Pol mit dem *isl1*-exprimierenden pharyngealen Mesoderm verbunden ist, sind die Isl1-positiven Zellen des venösen Pols im Zebrafärblingembryo räumlich von dem arteriellen Pol separiert (de Pater *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit war es aus zeitlichen Gründen nicht möglich zu klären, durch welchen Mechanismus Cofilin 2 die Expression von *isl1* und *mef2cb* reguliert. Eine Möglichkeit stellt hierbei die Rho/Aktin/MRTF-Signalkaskade dar, in der die Aktindynamik die SRF- (engl.: *serum response factor*) vermittelte Genexpression reguliert (siehe 1.6.,

Abb. 6). Bei SRF handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität für die Differenzierung der glatten und kardialen Muskelzellen benötigt wird (Landerholm *et al.*, 1999; Balza und Misra, 2006; Miano *et al.*, 2007). Die SRF-vermittelte Genexpression wird durch die Interaktion mit seinem Co-Aktivator MRTF (engl.: *myocardin-related transcription factor*) aktiviert, dessen Aktivität und die subzelluläre Lokalisation vom intrazellulären Level der Aktinmonomere kontrolliert werden (Abb. 6). Es kann angenommen werden, dass die durch Cofilin 2 regulierte lokale Konzentration des G- und F-Aktins die Aktivität von MRTF beeinflusst. Diese Theorie wird durch die Erkenntnisse einer früheren Studie unterstützt, die eine verstärkte Expression von SRF und seinen Zielgenen in den *ADF*-Mausmutanten dokumentiert (Verdoni *et al.*, 2008). Dieser Sachverhalt deutet eine Wechselwirkung zwischen ADF, einem Mitglied der ADF/Cofilin-Familie, und der SRF-Aktivität an.

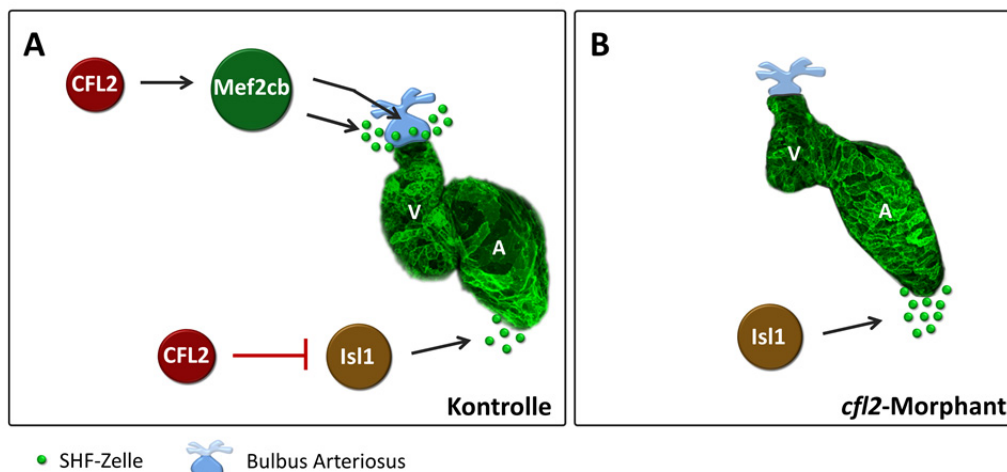


Abbildung 50. Modell zur Funktion von Cofilin 2 bei der Kontrolle der Kardiomyozytenzahl.

(A) Cofilin 2 aktiviert die Expression von *mef2cb* in den SHF-Zellen am arteriellen Pol, die die Differenzierung von *vmhc*-positiven Kardiomyozyten und von glatten Muskelzellen des Bulbus Arteriosus fördert. Am venösen Pol kontrolliert Cofilin 2 die Anzahl atrialer Kardiomyozyten durch die Limitierung der *isl1*-Expression. (B) *Cfl2*-Defizienz hat den Verlust der *mef2cb*-Expression in den SHF-Zellen am arteriellen Pol zur Folge, der wiederum zur Reduktion der ventrikulären Kardiomyozytenzahl und des Bulbus Arteriosus führt. Am venösen Pol resultiert die Abwesenheit von Cofilin 2 in einer Zunahme der *isl1*-positiven Kardiomyozyten und somit in der Vergrößerung des Atriums (A). V: Ventrikel.

3.4. Cofilin 2 reguliert die Links-Rechts-Körperasymmetrie im Zebrafärbling

Die Spezifizierung, Clusterbildung und Migration von DFCs (engl.: *dorsal forerunner cells*) sowie die Ziliogenese und Lumenbildung sind essentielle Prozesse der Entwicklung des Kupfferschen Vesikels (KV), das an der Etablierung des asymmetrischen Körperplans im Zebrafärbling maßgeblich beteiligt ist (siehe 1.8.1.3.). Ein Defekt in nur einer dieser Phasen

geht mit einer Störung des Situs einher (siehe 1.8.1.4.). In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass der Morpholino-vermittelte *Knockdown* von *cfl2* Lateralitätsdefekte des Herzens (Abb. 35) sowie des Darms und der Leber (Abb. 36) zur Folge hat. Die Randomisierung mehrerer Organe deutet auf einen Defekt im frühen Links-Rechts-Achsenspezifizierungsprozess hin. Dies konnte durch die randomisierte Expression des frühen asymmetrischen Markers *spaw* im 20-Somitenstadium von *cfl2*-Morphanten bestätigt werden (Abb. 37). Die irreguläre *spaw*-Expression lässt sich durch das deformierte KV der *cfl2*-Morphanten erklären, dessen ungestörte Funktion für die Initiierung der asymmetrischen Genexpression erforderlich ist (Essner *et al.*, 2005). Das KV *cfl2*-defizienter Embryonen ist in seiner Größe reduziert (Abb. 40A-C), weist eine deformierte Morphologie (Abb. 41) sowie weniger und kürzere Zilien auf (Abb. 40E-H) als das KV von Kontrollembryonen. Die reduzierte Zilienzahl ist das Ergebnis einer verminderten Anzahl an KV-Zellen (Abb. 40D), da jede Zelle des KV ein einzelnes Zilium (Monozilium) besitzt (Essner *et al.*, 2005). Das reduzierte Lumenwachstum des KV (Abb. 41) lässt sich ebenfalls auf die geringe Anzahl an Lumen-formenden Zellen zurückführen. Die Reduktion der Zilienlänge als eine Folge der *cfl2*-Defizienz (Abb. 40H) deutet auf eine Funktion von Cofilin 2 bei der Ziliogenese hin. Obwohl es sich bei Zilien um zelluläre Fortsätze aus Mikotubuli handelt, ist auch das Aktinzytoskelett in die Ziliogenese involviert (Yan und Zhu, 2013). Untersuchungen zum molekularen Mechanismus, der der Cofilin 2-abhängigen Zilienverlängerung zugrunde liegt, waren allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Das deformierte KV der *cfl2*-Morphanten ist der Rolle von Cofilin 2 als ein Regulator der Aktindynamik zuzuschreiben. Die Morphogenese des KV sowie aller anderen Organe erfordert die Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass die Beeinträchtigung der Cofilin 2-vermittelten Aktindynamik die irreguläre KV-Morphologie von *cfl2*-defizienten Embryonen hervorruft. In der Literatur werden die Reduktion der Anzahl und der Länge von Zilien sowie morphologische Defekte des KV stets im Zusammenhang mit einem gestörten Flüssigkeitsfluss innerhalb des KV berichtet, der letztlich Lateralitätsdefekte verursacht (Neugebauer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012; Oteiza *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011; May-Simera *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). Diese Funktionsstörung des KV wurde auch hier infolge des *cfl2*-*Knockdowns* festgestellt. Die Injektion von fluoreszierenden Beads illustrierte den fehlenden Zilien-getriebenen

Flüssigkeitsstrom innerhalb des KV von *cfl2*-Morphanten (Abb. 42). Demnach lässt sich schlussfolgern, dass Cofilin 2 für die Entwicklung eines funktionsfähigen KV essentiell ist.

Bei der Suche nach der Ursache für das anormale KV der *cfl2*-Morphanten konnte eine gestörte Spezifizierung der KV-Vorläuferzellen ausgeschlossen werden, da die Anzahl der DFCs bei 60 % Epibolie der der Kontrollembryonen entsprach (Abb. 43A). Es konnte hingegen ein direkter Zusammenhang zwischen der reduzierten Anzahl der KV-Zellen und der gestörten DFC-Clusterbildung hergestellt werden (Abb. 43B-N). Die defekte Adhäsion der DFCs von *cfl2*-defizienten Embryonen resultiert in einer anormalen Organisation dieser Vorläuferzellen. Die zerstreuten DFCs konvergieren und integrieren nicht in einen kompakten Zellverband, der bei den Kontrollembryonen zu beobachten war (Abb. 43K-N). Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus vorherigen Studien. In diesen wird demonstriert, dass die stabilen Zell-Zellkontakte zwischen den DFCs für die Ausbildung von kompakten Zellclustern und eine normale KV-Morphogenese unabdingbar sind (Matsui *et al.*, 2011; Ablooglu *et al.*, 2010; Oteiza *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2011). Zusätzlich konnte hier mit der TUNEL-Analyse gezeigt werden, dass die vereinzelter, kleineren DFC-Populationen Apoptose durchliefen (Abb. 44). Demzufolge wurde das KV von *cfl2*-Morphanten aus einer geringeren Anzahl an DFCs generiert und war somit in seiner Größe reduziert. Des Weiteren demonstrierte der DFC-spezifische *cfl2*-*Knockdown*, dass Cofilin 2 seine Funktion zellautonom in den DFCs ausübt (Abb. 39). Diese Daten wurden durch zwei Kontrollen validiert. Hierfür erfolgte die Injektion des Standard-Kontrollmorpholinos in die Blastula sowie die Inaktivierung von *cfl2* ausschließlich in der Dotterzelle. In beiden Fällen wurden keine Lateralitätsdefekte des Herzens beobachtet (Abb. 39). Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass Cofilin 2 die Clusterbildung der DFCs zellautonom reguliert, um das Überleben der DFCs und eine korrekte Morphogenese des KV sicherzustellen.

Eine entscheidende Frage richtet sich in diesem Zusammenhang nach dem molekularen Mechanismus, der der Cofilin 2-abhängigen Clusterbildung der DFCs zugrunde liegt. Diese Arbeit liefert einen entscheidenden Hinweis für eine funktionelle Assoziation zwischen Cofilin 2 und dem Integrin-Signalweg während der Ausbildung des DFC-Clusters. Anstoß für die diesbezüglichen Untersuchungen gab eine frühere Studie, die zeigt, dass Integrin- α V1 und Integrin- β 1b zelluläre Interaktionen vermitteln, die für die DFC-Clusterbildung bedeutsam sind (Ablooglu *et al.*, 2010). Während die hier durchgeführte Einzelinjektion des

integrin- α V1- bzw. *cfl2*-Morpholinos in einer reduzierten Dosis keinen Phänotyp hervorrief, erhielten diese in Kombination einen defekten DFC-Cluster sowie eine randomisierte Herzlokalisierung (Abb. 45). Dieser additive Effekt deutet eine synergistische Wirkung beider Faktoren bei der Ausbildung der DFC-Cluster an. In Zukunft gilt es zu klären, ob Cofilin 2 *upstream* oder *downstream* von Integrin- α V1 agiert. Beide Möglichkeiten sind denkbar, da Cofilin 2 zum einen die Reorganisation des Aktinzytoskeletts fördern könnte, die für die Regulation der Integrin-vermittelten Adhäsion erforderlich ist (Lub *et al.*, 1997; Yauch *et al.*, 1997). Zum anderen sind die kleinen GTPasen der Rho-Familie bekannte Effektoren der Integrin-Signalkaskade, die die Aktivität der ADF/Cofilin-Familienmitglieder durch die LIM-Kinasen regulieren (Abb. 9; Maekawa *et al.*, 1999; Scott und Olson, 2007).

Die Rho-GTPasen sind darüber hinaus *downstream* Effektoren des PCP- (engl.: *planar cell polarity*) Signalweges (siehe 1.6., Abb. 7). Der Verlust einiger PCP-Gene, wie z.B. *prickle1a* oder *vangl2*, hat eine gestörte DFC-Clusterbildung und Ziliogenese, sowie eine anormale Positionierung der Zilien zur Folge, die wiederum zu Links-Rechts-Asymmetriedefekten im Zebrafisch führen (Oishi *et al.*, 2006; Oteiza *et al.*, 2010; Aw und Levin, 2009; Zhang und Levin, 2009; Borovina *et al.*, 2010). Des Weiteren wurde in *Drosophila* demonstriert, dass der Verlust von Twinstar, dem *Drosophila*-Homolog von Cofilin, zu einer fehlerhaften Lokalisation der PCP-Proteine Frizzled und Flamingo in der Zellmembran führt (Blair *et al.*, 2006). Da zwei Flamingo-Homologe (*celsr1b*, *celsr1a*) im frühen Zebrafischembryo exprimiert werden (<http://zfin.org>), ist es denkbar, dass diese atypischen Cadherine an der Interaktion zwischen den DFCs beteiligt sind, die womöglich ebenfalls durch Cofilin 2 reguliert wird.

Darüber hinaus wiesen *cfl2*-Morphanten eine kürzere anterior-posteriore Körperachse, breitere Somiten und eine deformierte Chorda dorsalis während der Segmentierungsphase auf (Abb. 17). Dieser Phänotyp reflektiert charakteristische Merkmale einer gestörten konvergenten Extension, die von PCP gesteuert wird (Wallingford *et al.*, 2002; Marlow *et al.*, 2002; Park und Moon, 2002; Jessen, 2012). Weiterhin zeigt eine aktuelle Studie, dass Cofilin 1 in die Etablierung der planaren Zellpolarität im Mausembryo involviert ist. Diese ist für die konvergente Ausdehnung der embryonalen Mittellinie sowie für die posteriore Positionierung der Monozilien im ventralen Primitivknoten erforderlich. Diese Ausrichtung gewährleistet einen effektiven Zilienschlag zur linken Seite und eine korrekte Initiierung der Links-Rechts-Asymmetrie (Cartwright *et al.*, 2004; Nonaka *et al.*, 2005; Kramer-Zucker *et al.*,

2005; Okada *et al.*, 2005). Die Mutation des einzelnen *Cofilin 1*-Gens zieht allerdings weder PCP- noch Lateralitätsdefekte nach sich. Die daraus angedeutete Redundanz der ADF/Cofilin-Familienmitglieder konnte in diesem Zusammenhang für Destrin und Cofilin 1 belegt werden (Mahaffey *et al.*, 2013). Es ist durchaus denkbar, dass Cofilin 2 ebenfalls an der PCP-gesteuerten Determinierung der Links-Rechts-Achse von Säugetieren und Zebrafärblingen mitwirkt. Die hier erfolgte Detektion der *Cfl2*-Expression am E7.5 (Abb. 15B), an dem der Symmetriebruch im ventralen Primitivknoten stattfindet, unterstützt die Vermutung einer möglichen Beteiligung von Cofilin 2 an der Ausbildung der Links-Rechts-Achse im Mausembryo.

Cofilin 1 wird im Zebrafärblingembryo wie in der Maus ubiquitär exprimiert (Lin *et al.*, 2010), ist aber offenbar nicht ausreichend, um die *cfl2*-Defizienz bei der Links-Rechts-Achsendeterminierung und der Herzentwicklung auszugleichen. Demnach ist es denkbar, dass sich das Maß der Kompensationsfähigkeit von ADF/Cofilin zwischen Fisch und Säugetier unterscheidet. Unterschiede im Expressionsniveau der ADF/Cofilin-Gene sowie in dem Regulationssystem, das die Aktivität der ADF/Cofilin-Proteine kontrolliert, könnten die Ursache für das unterschiedliche Maß der Kompensation zwischen diesen Vertebraten sein. Dass der Phänotyp der *cfl2*-Morphanten in Hinsicht auf die essentielle Funktion von Cofilin 2 in der Regulation der Aktindynamik relativ mild ist, ist höchstwahrscheinlich auf eine Redundanz der *cofilin*-Gene zurückzuführen.

Die Zell-Zellkontakte zwischen den DFCs werden neben Integrin- α V1 und Integrin- β 1b zusätzlich durch E-Cadherine aufrechterhalten (Matsui *et al.*, 2011). Um zu testen, ob Cofilin 2 an der Regulation der E-Cadherin-vermittelten DFC-Adhäsionen beteiligt ist, erfolgte die Evaluierung der immunchemischen Detektion von E-Cadherin-Molekülen in der Plasmamembran der DFCs. Aus der unveränderten Verteilung der E-Cadherine in der DFC-Membran nach dem *Knockdown* von *cfl2* (Abb. 46) lässt sich schließen, dass Cofilin 2 nicht *upstream* von E-Cadherin agiert, um die DFC-Clusterbildung zu kontrollieren. Dieses Erkenntnis liefert eine mögliche Erklärung für die intakten Adhäsionen einiger DFCs der *cfl2*-Morphanten. Die Zell-Zell-Interaktionen, die in einigen DFCs *cfl2*-defizienter Embryonen weiterhin bestehen blieben (Abb. 43M, N), wurden möglicherweise durch E-Cadherine vermittelt. Dagegen ist die Alcama-vermittelte Adhäsion in diesem Zusammenhang nicht relevant, da zum einen die *alcama*-Expression erstmals im 7-Somitenstadium detektierbar ist, nachdem sich das KV bereits entwickelt hat (hier nicht gezeigt; Mann *et al.*, 2006). Zum

anderen wiesen die *alcama*-Morphanten keine Lateralitätsdefekte auf (Abb. 5). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Cofilin 2 essentiell für den frühen Links-Rechts-Spezifizierungsprozess einschließlich der DFC-Clusterbildung, KV-Morphogenese und Ziliogenese ist. Weiterhin besteht eine funktionelle Verbindung zwischen Cofilin 2 und dem Integrin-Signalweg, die der Förderung von Adhäsionen zwischen den DFCs dient und somit die Initiierung der Links-Rechts-Asymmetrie sichert (Abb. 51).

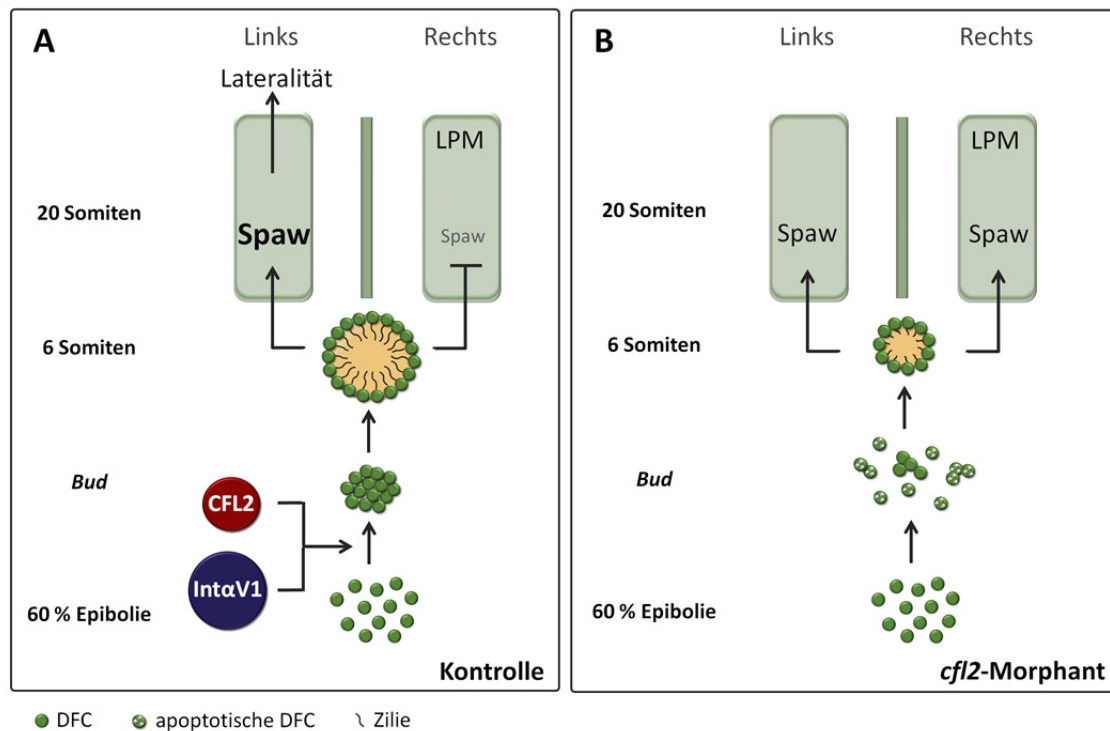


Abbildung 51. Modell zur Funktion von Cofilin 2 bei der Regulation der Links-Rechts-Achsen-determinierung.

(A) Die synergistische Regulation der DFC-Clusterbildung durch Cofilin 2 und Integrin- α V1 gewährleistet die Entwicklung eines funktionsfähigen KV. Der Zilien-getriebene Flüssigkeitsstrom innerhalb des KV generiert eine asymmetrische Expression von *spaw* im linken lateralen Plattenmesoderm (LPM), die die spätere Positionierung der Organe vermittelt. (B) Der Verlust der Cofilin 2-Funktion hat eine gestörte Clusterbildung der DFCs zur Folge. Während die vereinzelter DFCs Apoptose durchlaufen, bilden die restlichen einen kleinen, dysfunktionalen KV mit reduzierter Anzahl und Länge der Zilien. Infolge eines fehlenden Flüssigkeitsstroms resultiert eine randomisierte *spaw*-Expression und Organlokalisierung.

3.5. Die Überexpression und der *Knockdown* von *cfl2* stören die Aktindynamik

Die hier durchgeführten Überexpressionsstudien sollten weitere Erkenntnisse über die Rolle von Cofilin 2 während der Embryogenese liefern. Die Injektion der *cfl2*-mRNA ergab eine partielle Phänokopie des Herzens *cfl2*-defizienter Embryonen (Abb. 32; 20). Zudem resultierten aus der Überexpression und dem *Knockdown* von *cfl2* identische DFC- und KV-

Defekte, die in beiden Situationen zur Randomisierung der Herzlokalisierung führten (Abb. 47; 35; 40; 43). Da sich sowohl der Verlust als auch der Überschuss an Cofilin 2 ähnlich auf die embryonale Entwicklung des Zebrafärblings auswirken, blieb der Rettungsversuch von *cfl2*-Morphanten durch die Injektion der *cfl2*-mRNA erfolglos. Verglichen mit *cfl2*-Morpholino- bzw. *cfl2*-mRNA-injizierten Embryonen zeigten die co-injizierten Embryonen deutlich stärkere Defekte (Abb. 33). Die Co-Injektion von Morpholino und mRNA scheint einen additiven anstatt eines kompensierenden Effekts zu haben.

Die Organmorphogenese bedarf einer hohen Dynamik der Aktinstrukturen, die offenbar sowohl durch den *Knockdown* als auch durch die Überexpression von *cfl2* beeinträchtigt wird. In beiden Fällen war weder eine komplette Aktindepolymerisation noch eine deutliche Anreicherung des F-Aktins in der Skelettmuskulatur oder den DFCs zu beobachten (Abb. 31, 44). Es konnte vielmehr eine gestörte Organisation der Aktinfilamente festgestellt werden (Abb. 31). Diese Erkenntnisse stimmen mit denen aus der Literatur überein, in der beschrieben wird, dass sowohl der Verlust als auch die Überexpression der muskelspezifischen Cofilin-Isoform eine defekte Organisation der sarkomerischen Aktinfilamente zur Folge haben (Miyauchi-Nomura *et al.*, 2012; Skwarek-Maruszczyńska *et al.*, 2009; Ono *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 1996). Dies lässt sich durch die vielfältige Wirkung der ADF/Cofilin-Proteine auf das Aktinzytoskelett erklären, die von ihrer lokalen Konzentration abhängig ist (siehe 1.7.2., Abb. 8). Somit kann angenommen werden, dass die streng regulierte lokale Konzentration von aktivem Cofilin 2 von enormer Bedeutung für die Reorganisation des Aktinzytoskeletts ist. Die Aktivität der überschüssigen Cofilin 2-Proteine kann offenbar nicht durch die posttranslationalen Modifikationen auf das adäquate Normalniveau reguliert werden. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein erhöhtes oder reduziertes Expressionsniveau von Cofilin 2 eine irreguläre Organisation des Aktinzytoskeletts hervorruft, die wiederum die adhäsiven Eigenschaften der Zellen verändert und somit eine gestörte Morphogenese des KV und des Herzens zur Folge hat.

Rückblickend konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit wichtige Erkenntnisse über neue Funktionen von Cofilin 2 während der Embryonalentwicklung im Zebrafärbling gewonnen werden:

- Cofilin 2 steuert die Alcama-vermittelte Herzmorphogenese
- Cofilin 2 reguliert Herzkammer-spezifisch die Differenzierung der SHF-Zellen
- Cofilin 2 kontrolliert die Entwicklung des Lateralitätsorgans

3.6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte Cofilin 2 als ein neuer Interaktionspartner von Alcama identifiziert werden. Zudem konnte eine bislang unbekannte Rolle von Cofilin 2 während der embryonalen Herzentwicklung im Zebrafisch aufgezeigt werden. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob es sich bei der Interaktion mit Alcama um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt. Zur Klärung dieser Fragestellung könnte ein Peptid-*Pulldown* beitragen, durch den die Wechselwirkung zwischen einem synthetisch hergestellten Peptid, das die Aminosäuresequenz der zytoplasmatischen Domäne von Alcama abdeckt, und dem aufgereinigten Cofilin 2-Protein untersucht werden kann. Da Cofilin 2 im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist, wäre im Fall einer direkten Interaktion nur dessen Bindung an die intrazelluläre Domäne von Alcama denkbar. Alternativ zu dem Peptid-*Pulldown* könnte ebenso das *Yeast Two-Hybrid*-System zum Nachweis einer möglichen Bindung zwischen Cofilin 2 und der zytoplasmatischen Domäne von Alcama genutzt werden. Das *Split-Ubiquitin*-System würde dagegen die Interaktionsanalyse zwischen Cofilin 2 und dem kompletten Transmembranprotein Alcama ermöglichen.

Cofilin 2 kontrolliert, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, die Expression von *mef2cb* und *isl1* während der embryonalen Herzentwicklung. Aufgrund der Aktin-modulierenden Aktivität von Cofilin 2 kann spekuliert werden, dass Cofilin 2 dabei die Genexpression über den Rho/Aktin/MRTF-Signalweg beeinflusst. Dieser potentielle Regulationsmechanismus könnte durch eine Expressionsanalyse von bereits bekannten SRF-Zielgenen in *cfl2*-Morphen untersucht werden. Zudem würde eine veränderte subzelluläre Lokalisation von MRTF infolge der *cfl2*-Defizienz (z. B. eine nukleäre Translokation) ein weiteres Indiz für eine funktionelle Beziehung zwischen Cofilin 2 und der SRF-vermittelten Genexpression liefern. Einen zusätzlichen Hinweis auf den vermuteten Mechanismus könnte die Detektion einer veränderten Expression von *mef2cb* bzw. *isl1* nach einer pharmakologischen Inhibition des Rho/Aktin/MRTF-Signalweges geben.

Weitergehende Analysen sind auch erforderlich, um zu verstehen, wie Cofilin 2 in den Integrin- α V1-vermittelten Signalweg involviert ist. Lokalisationsstudien von Integrin- α V1 und Cofilin 2 in Kontroll- sowie *integrin- α V1*- und *cfl2*-defizienten Embryonen könnten klären, ob Cofilin 2 *upstream* oder *downstream* von Integrin- α V1 agiert. Dieser experimentelle Ansatz könnte auch Aufschluss über die mögliche Wechselwirkung zwischen Cofilin 2 und PCP während der Lateralitätsdeterminierung geben. Die Analyse der

subzellulären Lokalisation vorallem von Celsr1b und Celsr1a in den DFCs von *cf/2*-defizienten Embryonen könnte hierfür einen wichtigen Hinweis liefern.

Die Aufklärung der regulatorischen Mechanismen, welche die embryonale Entwicklung des Säugetierherzens steuern, ist eine Voraussetzung für ein besseres Verständnis der Entstehung angeborener Herzfehler. Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, detaillierte Analysen zur Übertragbarkeit der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Funktion von Cofilin 2 während der Ausbildung der Links-Rechts-Achse und der Herzentwicklung im Zebrafisch auf das Maus-Modell durchzuführen.

4. MATERIALIEN

4.1. Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
1-Phenyl-2-thiourea (PTU)	Acros
100x Penicillin/Streptomycin	Gibco
β -Mercaptoethanol	Roth
Acrylamid-Bis Lösung (37.5:1), 40%	Serva
Agarose	Roth
Agarose <i>Low Melt</i>	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampicillin Natriumsalz	Roth
<i>Blocking Reagent</i> Pulver	Roche
Borsäure	Roth
Bradford Reagenz, <i>ready-to-use</i>	Thermo Scientific
Chloroform	Roth
Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	Sigma-Aldrich
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet</i>	Santa Cruz Biotechnology
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat	Fisher Scientific
Dithiothreitol (DTT)	Roth
DMEM 1 g GlutMax	Gibco
DNA-Marker-Mix	Thermo Scientific
dNTP Set	Thermo Scientific
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Roth
Formaldehyd 10%	Polysciences
Formamid	Merck
Fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Gibco
Glycin	Roth
Glyzerin	Roth
Halocarbon-Öl 27	Sigma-Aldrich
Hefe-tRNA	Invitrogen
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
Isopropanol	Serva
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Fisher Scientific
Kanamycinsulfat	Roth

Chemikalie	Bezugsquelle
LB-Agar (Lennox)	Roth
LB-Medium (Lennox)	Roth
Levamisol	Fluka
Lithiumchlorid	Roth
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat	Fisher Scientific
Maleinsäure	Roth
Methanol	Roth
Methylenblau	Alfa Aesar
Milchpulver	Fluka
Natriumacetat	Roth
Natriumcarbonat	KGaA
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Roth
NBT/BCIP-Stammlösung	Roche
Oligo-dT-Primer	Invitrogen
<i>Page Ruler</i> vorgefärbter Proteinmarker	Thermo Scientific
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:24:1	Roth
Phenolrot	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich
<i>Red Alert</i> 10x Western Blot Färbelösung	Novagen
Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i> , BSA)	Merck
Salzsäure (HCl)	Roth
Schafserum	Santa Cruz Biotechnology
SDS Pellets	Roth
Sucrose	Sigma-Aldrich
SuperSignal West Femto Chemilumineszenz Substrat	Thermo Scientific
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich
Tricain Methansulfonat (Tricain)	Pharmaq
Triethanolamin	Sigma-Aldrich
Trinatriumcitrat Dihydrat	Roth
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Roth
TRIzol RNA Isolierungsreagenz	Invitrogen
Tween 20	Roth

4.2. Kits

Kit	Bezugsquelle
<i>CloneJET PCR Cloning Kit</i>	Thermo Scientific
<i>Colloidal Blue Staining Kit</i>	Invitrogen
<i>DIG RNA Labeling Kit (Sp6/T7)</i>	Roche
<i>In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein</i>	Roche
<i>mMESSAGE mMACHINE Kit</i>	Ambion
<i>NucleoBond Xtra Midi</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin Plasmid</i>	Macherey-Nagel
<i>SuperScript III Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen
<i>Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega

4.3. Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
<i>Fast Digest Restriktionsenzyme + Fast Digest Puffer</i>	Thermo Scientific
Phusion DNA-Polymerase	Thermo Scientific
Protease aus <i>Streptomyces griseus</i> (Pronase)	Sigma-Aldrich
Proteinase K aus <i>Engyodontium album</i>	Sigma-Aldrich
RNaseOUT Rekombinanter RNase Inhibitor	Invitrogen
T3 RNA-Polymerase	Roche
T4 DNA-Ligase	Thermo Scientific

4.4. Farbstoffe, Inhibitoren

Farbstoff/Beads	Verdünnung/ Endkonzentration	Bezugsquelle
DAF-FM Diacetat	10 µM	Invitrogen
Dextran, Rhodamin B, 10000 MW, neutral	1:10	Invitrogen
<i>Fluoresbrite Plain Red 0,5 µm Microspheres</i>	1:50	Polysciences
Rhodamin-Phalloidin	1:75 IF	Invitrogen
TO-PRO-3 Iodid	1:2000 IF	Invitrogen

IF: Immunfluoreszenz

Inhibitor	Endkonzentration	Bezugsquelle
Cytochalasin D	20 µM	Sigma-Aldrich
Latrunculin B	2 µM	AdipoGen

4.5. Antikörper

Primärer Antikörper	Wirt	Verdünnung/ Menge	Bezugsquelle
Anti-acetyliertes Tubulin (mk)	Maus	1:300 IF	Sigma-Aldrich (T6793)
Anti-Alcama, zn-8 (mk)	Maus	1:10 IF, 5 µg IP	Hybridoma Bank
Anti-AMHC, S46 (mk)	Maus	1:10 IF	Hybridoma Bank
Anti-BrdU (mk)	Ratte	1:200 IF	Abcam (ab6326)
Anti-Cofilin 2 (pk)	Kaninchen	1:1500 WB	Abcam (ab14133)
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente		1:2000 WISH	Roche (11093274910)
Anti-DsRed (pk)	Kaninchen	1:250 IF	Clontech (632496)
Anti-GFP (pk)	Kaninchen	1:500 IF	Novus Biologicals (NB600-308)
Anti-GFP (mk)	Maus	1:300 IF	Roche (11814460001)
Anti-HA (Y-11) (pk)	Kaninchen	1:800 WB	Santa Cruz Biotechnology (sc-805)
Anti-Isl 39.4D5 (mk)	Maus	1:10 IF	Hybridoma Bank
Anti-Pan-Cadherin (pk)	Kaninchen	1:500 IF	Sigma-Aldrich (C3678)
Anti-PKCζ (C-20) (pk)	Kaninchen	1:100 IF	Santa Cruz Biotechnology (sc-216)
Anti-α-Tubulin B-5-1-2 (mk)	Maus	1:8000 WB	Sigma-Aldrich (T5168)

mk: monoklonal; pk: polyklonal; WB: Western Blot; IP: Immunpräzipitation; IF: Immunfluoreszenz; WISH: *Whole Mount in situ*-Hybridisierung

Sekundärer Antikörper	Wirt	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	Ziege	1:500 IF	Invitrogen
Anti-Kaninchen Alexa Fluor 594	Esel	1:500 IF	Invitrogen
Anti-Maus Alexa Fluor 488	Ziege	1:500 IF	Invitrogen
Anti-Maus Alexa Fluor 594	Esel	1:500 IF	Invitrogen
Anti-Maus Alexa Fluor 647	Ziege	1:500 IF	Invitrogen
Anti-Ratte Alexa Fluor 488	Huhn	1:500 IF	Invitrogen
Anti-Kaninchen Peroxidase-gekoppelt	Ziege	1:1000 WB	Thermo Scientific
Anti-Maus Peroxidase-gekoppelt	Ziege	1:1000 WB	Thermo Scientific

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz

4.6. Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Bakterieninkubator 37 °C	Nalge Nunc International
Binokular SZB 300	VWR
Bio Photometer	Eppendorf
Bioruptor	Diagenode
Camcorder HDR-SR12	Sony
Feinwaage	Denver Instrument
Fluoreszenzmikroskop DM6000B	Leica
Heizblock MR Hei-Standard	Heidolph-Instruments
Injektor Pneumatic PicoPump PV820	World Precision Instruments
Inkubationsschüttler 37 °C	Thermo Scientific
Inkubator für Zebrabärblingembryonen 28 °C	Advantage-Lab
Konfokales Mikroskop LSM 710	Zeiss
LAS-4000 <i>Luminescence Imager</i>	Fujifilm
<i>Micropipette Puller</i>	Sutter Instrument CO
Nanodrop 2000c Spektrophotometer	peQLab Biotechnology
PxE Thermozykler PCR Maschine	Thermo Scientific
pH-Meter	Hanna Instruments
Rotator SB3	Stuart
SDS-PAGE Apparat	Bio-Rad
Stereomikroskop M165FC	Leica
Stereomikroskop MZ16FA	Leica
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Julabo U3	Julabo Labortechnik
Wasserbad Zellkultur WMB 22	Memmert
Wet-Blotter	Bio-Rad
Wippe	VWR
Zellkultur Inkubator BBD 6220	Heraeus
Zentrifuge Heraeus 1S-R	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Scientific
Zentrifuge Heraeus Pico 17	Thermo Scientific
Zentrifuge Sigma 4-10	B.Braun Biotech International

4.7. Zubehör

Zubehör	Bezugsquelle
10 cm Petrischalen	Greiner Bio-One
12-Wellplatten	Greiner Bio-One
24-Wellplatten	Greiner Bio-One
Chromatographie-Papier 27 cm x 100 m	Whatman
Glaskapillaren 1,0 mm	World Precision Instruments
Halbmikro-Küvetten 1,6 ml	Greiner Bio-One
<i>Microloader</i> Pipettenspitzen	Eppendorf
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris-Gele	Invitrogen
Objektmikrometer für Auflicht 1mm in 100 Teile	Novex
Petrischalen mit Glasboden 35 mm	Mat Tek Corporation
Präzisionspinzetten Dumont 5	Roth
Protein G Sepharose 4 <i>Fast Flow</i>	GE Healthcare
Protran BA 85 Nitrocellulose Membran 0,45µm, 15cm x 3m	GE Healthcare

4.8. Puffer, Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x Agarose-Auftragspuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 60 % (v/v) Glycerin 50 mM Tris pH=7,6
10x Blockierlösung (WISH)	10 % (w/v) <i>Blocking Reagent</i> Pulver in MABT
10x Lämmli-Puffer	0,2 M Tris 2 M Glycin 1 % (w/v) SDS pH=8,4-8,9
10x MAB	1 M Maleinsäure 1,5 M NaCl pH mit NaOH-Plätzchen auf 7,5 einstellen
10x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 80 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ pH=7,4
10x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure (H ₃ BO ₃) 20 mM Na ₂ EDTA pH=8,0

4. Materialien

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
10x TBS	0,5 M Tris 2 M NaCl
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat Dihydrat ($C_6H_9Na_3O_9 \cdot 2H_2O$) pH=7,0
4 % PFA	20 g PFA bei 65-70 °C in 500 ml ddH ₂ O lösen pH mit NaOH auf 7,5 einstellen 55 ml 10x PBS zufügen, bei -20 °C lagern
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH= 6,8
4x SDS-PAGE Puffer	15 % (v/v) Glyzerin 4 % (v/v) SDS 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol 1x Sammelgelpuffer 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS pH= 8,8
AP-Puffer (WISH)	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl pH=9,5
BBA	Benzylbenzoat:Benzyalkohol 2:1 (v/v)
Blockierlösung (IF)	5 % Schafserum 1 % BSA 1 % DMSO 0,3 % Triton X-100 in PBS
Blockierlösung (WB)	5 % (w/v) Milchpulver 0,1 % (v/v) Tween 20 in 1x PBS
DEPC-H ₂ O	800 μ l DEPC pro Liter H ₂ O über Nacht unter dem Abzug halb geöffnet stehen lassen, ausdampfen lassen autoklavieren
E3-Medium	5 mM NaCl 0,17 mM KCl 0,33 mM CaCl ₂ 0,33 mM MgSO ₄
Homogenisierungspuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ 1 % (w/v) Sucrose 1 % (v/v) Igepal 100 mM NaCl
Hybridisierungspuffer (WISH)	50 % (v/v) Formamid 25 % (v/v) 20x SSC pH=4,5 35 mM SDS 50 mg/l (w/v) Heparin 50 mg/l (w/v) Hefe-tRNA

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Lösung 1 (WISH)	50 % (v/v) Formamid 25 % (v/v) 20x SSC pH=4,5 35 mM SDS
MABT	0,1 % (v/v) Tween 20 in MAB
PBS-DT	0,1 % (v/v) DMSO 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
PBST	0,3 % (v/v) Triton X-100 in PBS
PBT	0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
<i>Stripping-Lösung 1</i>	200 mM Glycin 500 mM NaCl pH=2,8
<i>Stripping-Lösung 2</i>	200 mM Glycin 500 mM NaCl pH=2,2
<i>Stripping-Lösung 3</i>	200 mM Tris-HCl pH= 7,4
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20 % (v/v) Methanol (frisch zugeben)
Tris-EDTA-Lösung	10 mM Tris 1 mM EDTA 0,05 % (v/v) Tween 20 pH=8,0

WB: Western Blot; IF: Immunfluoreszenz; WISH: *Whole Mount in situ*-Hybridisierung

4.9. Vektoren

Plasmid	Bezugsquelle	Beschreibung
pCMV-SPORT6.1::Alcama	ImaGenes: IRBOP991C0577D	Eukaryotischer Expressionsvektor pCMV-SPORT6.1 mit kodierender Sequenz von <i>Zf-alcama</i> für die Überexpression in eukaryotischen Zellen
pCDNA3-FLAG-HA	Labor Dobрева	Eukaryotischer Expressionsvektor pcDNA3 mit N-terminaler FLAG-HA-Sequenz für die Überexpression in eukaryotischen Zellen
pJET1.2/blunt	Thermo Scientific	Linearisierter Klonierungsvektor mit " <i>blunt ends</i> ", Rezirkulation führt zur Synthese eines lethalen Restriktionsenzym
pCS2(+)	Labor Stainier	Eukaryotischer Expressionsvektor für Sonden- und mRNA-Synthese

4.10. Synthetische Oligonukleotide, Morpholinos

Die unten aufgeführten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon bezogen.

F: *Forward*-Primer, R: *Reverse*-Primer.

Für die Klonierung:

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
Cfl2-WISH-HindIII-F	TATA <u>AAGCTT</u> CGGCTTATATGATGCCACT
Cfl2-WISH-XbaI-R	TAATCTAGAATAAGGGGCCCTTATCCATC
Cfl2-Flag-HA-BamHI-F	<u>GGATCC</u> GCCTCTGGTGTACAGTCAGT
Cfl2-Flag-HA-NotI-R	<u>GCGGCCGC</u> CAATGGTCTTCCCTCCAGCGAT

Unterstrichene Nukleotide markieren die im Primernamen enthaltenen Restriktionsschnittstellen.

Für die RT-PCR:

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
Cfl2-5'UTR-F	ATCGCATCGGACAGCATG
Cfl2-Intron-R	GCTTAAGGGGGCTAATAATATTGAC
GAPDH-F	TGGGTGTCAACCATGAGAAA
GAPDH-R	AACCTGGTGCTCCGTGTATC

Die unten aufgeführten Morpholinos wurden von Gene Tools bezogen.

Morpholino	Sequenz (5'-3')
Alcama-ATG	TTTATACAGTCCGGCGACAGTCTCA
Clf2-ATG	CATGCTGTCCGATGCGATGAATCGA
Cfl2-Spl	AACCGACACACACTACATACCAAAA
Isl1-Spl	GAATGCAATGCCTACCTGCCATTTG
Integrin- α V1-ATG	AGTGTTTGCCCATGTTTTGAGTCTC
Standard-Kontrolle	CCTCTTACCTCAGTTACAATTATA

4.11. Organismen

Bakterienstamm/ Zelllinie	Genotyp/Beschreibung
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogen)	<i>F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galk16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>
HEK293T	ATCC-Nr.: CRL-11268 TM . Humane embryonale Nierenzellen. Diese exprimieren konstitutiv das große SV40 T-Antigen.

Zebrabärblinglinie	Referenz	Beschreibung
<i>Tg(-5.1myl7:nDsRed2)^{f2}</i>	Mably <i>et al.</i> , 2003	DsRed-NLS-Expression unter Kontrolle des <i>myl7</i> -Promoters
<i>Tg(kdrl:EGFP)^{s843}</i>	Jin <i>et al.</i> , 2005	GFP-Expression unter Kontrolle des <i>kdrl</i> -Promoters
<i>Tg(myl7:EGFP-HsHRAS)^{s883}</i>	D'Amico <i>et al.</i> , 2007	EGFP-HsHRAS-Expression unter Kontrolle des <i>myl7</i> -Promoters
<i>Tg(myl7:mCherry-HsHRAS)^{sd21}</i>	Yoruk <i>et al.</i> , 2012	mCherry-HsHRAS-Expression unter Kontrolle des <i>myl7</i> -Promoters
<i>Tg(nkx2.5:GFP)</i>	Witzel <i>et al.</i> , 2012	GFP-Expression unter Kontrolle des <i>nkx2.5</i> -Promoters
<i>Tg(sox17:GFP)^{s870}</i>	Chung and Stainier, 2008	GFP-Expression unter Kontrolle des <i>sox17</i> -Promoters

5. METHODEN

Grundlegende molekularbiologische Methoden, die hier nicht gesondert aufgeführt sind, erfolgten nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) bzw. nach Angaben des Herstellers. Hierzu zählen:

- Restriktionsverdau mit *Fast Digest* Enzymen im *Fast Digest* Puffer (Thermo Scientific)
- Auftrennung von DNA durch die Agarose-Gelelektrophorese
- Auftrennung von RNA durch die Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese
- Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mit Nanodrop 2000c Spektrophotometer (peQLab)
- Sequenzierung von DNA-Proben bei StarSEQ in Mainz
- Isolierung und Aufreinigung von DNA (Wizard SV Gel und PCR Clean-Up System, Promega)
- Plasmid-DNA-Präparation (NucleoBond Xtra Midi-Kit von Macherey-Nagel für Midipräparation, NucleoSpin Plasmid-Kit von Macherey-Nagel für Minipräparation)
- Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

5.1. Molekularbiologische Methoden

5.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Standardmethode zur Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. Hierfür wurden die im Abschnitt 4.10. aufgelisteten Primer und die thermostabile DNA-Polymerase Phusion verwendet. Der PCR-Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Volumen/Menge
5x Phusion HF Puffer	10 µl
10 mM dNTPs	1 µl
10 pmol/µl <i>Forward</i> -Primer	2 µl
10 pmol/µl <i>Reverse</i> -Primer	2 µl
DNA-Matrize	1 pg-10 ng Plasmid-DNA 50-250 ng cDNA
100 % DMSO	1,5 µl
Phusion DNA-Polymerase (2U/µl)	0,5 µl
ddH ₂ O	auf 50 µl auffüllen

Die PCR-Reaktion erfolgte nach folgendem Programm:

Schritt	Temperatur	Dauer	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	} 30 x
Annealing	60-68 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30-60 sec	
Finale Elongation	72 °C	5 min	

Die Annealingtemperatur wurde für jedes Primerpaar anhand der jeweiligen Schmelztemperaturen und unter der Anleitung des Herstellers (Phusion DNA-Polymerase, Thermo Scientific) bestimmt. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz eingestellt (z.B. für cDNA: 40 sec pro 1 kb).

5.1.2. Ligation

Die zu klonierenden PCR-Produkte wurden in den pJET1.2/blunt-Vektor mit Hilfe des „CloneJET PCR Cloning“-Kits ligiert. Hierbei erfolgte die Ligation von 50 ng Vektor mit der Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:5. Nach der Zugabe von 1x Reaktionspuffer und 1 µl T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurde der Ligationsansatz für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei der Verwendung anderer Vektoren (siehe 4.9.) wurden 50-100 ng Plasmid-DNA mit der fünffachen molaren Menge an Insert-DNA in 1x T4-Ligationspuffer mit 1 µl T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 10 µl über Nacht bei RT ligiert.

5.1.3. RNA-Isolierung

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus 48 hpf alten *cf/2*-Spl-Morphanten und Kontrollembryonen erfolgte mit dem TRIzol Reagenz. Hierfür wurden 15 Embryonen zunächst in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß mit 100 µl TRIzol gemörsert. Nach Zugabe von weiteren 900 µl TRIzol wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt weiter verarbeitet. Die auf Eis aufgetauten, homogenisierten Embryonen wurden mit 200 µl Chloroform versetzt, kräftig geschüttelt, 5 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 11200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach der Phasentrennung wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol schlossen sich die Fällung der RNA bei -20 °C über Nacht

und ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 11200 rpm und 4 °C an. Die gefällte RNA wurde zweimal in 80 %-igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 8800 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die luftgetrocknete RNA wurde in 20 µl ddH₂O resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA wurde am Nanodrop durchgeführt.

5.1.4. Reverse-Transkription (RT)

Für die Synthese von cDNA aus der isolierten RNA wurde das „*SUPERSCRIPTTM III Reverse Transcriptase*“-Kit verwendet. Hierbei wurden Oligo-dT-Nukleotide als Primer eingesetzt, die komplementär zum Poly(A)-Schwanz der mRNA sind. Im zweiten Reaktionsschritt wurden diese durch die Reverse Transkriptase mittels dNTPs entlang der Matrize in 5'-3'-Richtung zu einer cDNA verlängert. Der Reaktionsansatz der Reversen-Transkription setzte sich wie folgt zusammen:

11 µl RNA (3 µg)
1 µl Oligo-dT-Primer
1 µl 10 mM dNTPs

Nach der Inkubation für 5 min bei 65 °C zum Denaturieren der RNA und anschließend für mindestens 1 min auf Eis folgte die Zugabe folgender Reagenzien:

4 µl 5x *First-Strand* Reaktionspuffer
2 µl 0,1 M DTT
1 µl RNase OUT
1 µl Superscript III Reverse Transkriptase (200U/µl)

Dieser 20 µl-Reaktionsansatz wurde im Thermoblock zunächst für eine Stunde bei 50 °C und anschließend für 15 min bei 70 °C inkubiert. Nach der cDNA-Synthese erfolgte der Verdau der RNA durch die Zugabe von 1 µl RNaseH und eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.1.5. Sonden-Synthese

Für die Synthese Digoxigenin- (DIG) markierter RNA-Sonden für die *in situ*-Hybridisierungsanalysen wurden die Plasmide zunächst mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert (die verwendeten Restriktionsenzyme sind in der unten stehenden Tabelle zusammengefasst). Linearisierte Plasmid-DNA wurde einer Phenol-Chloroform-Reinigung mit anschließender Präzipitation (siehe 5.1.7.) unterzogen und diente

als Matrize für die Sonden-Synthese, die unter Verwendung des „DIG RNA Labeling“-Kits nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt wurde. Hierfür wurde je nach Orientierung der cDNA-Fragmente die Sp6-, T7- bzw. T3-RNA Polymerase eingesetzt (siehe Tabelle unten). Zur Ermittlung der Orientierung, mit der die Fragmente in den Vektor aufgenommen wurden, erfolgte die Sequenzierung der Vektoren bei StarSEQ in Mainz. Die generierte RNA wurde anschließend durch die Zugabe von 2,5 µl 4 M Lithiumchlorid und 75 µl kaltem Ethanol bei -20 °C über Nacht präzipitiert. Nach der 30-minütigen Zentrifugation bei 13300 rpm und 4 °C wurde die RNA mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut bei 13300 rpm für 5 min und 4 °C zentrifugiert, luftgetrocknet und in 30 µl ddH₂O gelöst. Die Qualität der generierten Sonden wurde mit Hilfe einer Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese ermittelt. Die Lagerung der Sonden erfolgte bei -80 °C.

Gen	Plasmid	Enzym	RNA-Polymerase	Sondentyp	Bezugsquelle/Referenz
<i>amhc</i>	pCMV-Sport6	EcoRI	Sp6	<i>Antisense</i>	Labor Stainier, Berdougou <i>et al.</i> , 2002
<i>cfl2</i>	pCS2(+)	HindIII	T7	<i>Antisense</i>	diese Arbeit
<i>cfl2</i>	pJET1.2/blunt	XbaI	T7	<i>Sense</i>	diese Arbeit
<i>foxa1</i>	unbekannt	BamHI	T7	<i>Antisense</i>	Labor Aanstad
<i>isl1</i>	pJET1.2/blunt	EcoRI	T7	<i>Antisense</i>	Labor Dobрева, Witzel <i>et al.</i> , 2012
<i>mef2cb</i>	pJET1.2/blunt	XbaI	T7	<i>Antisense</i>	Labor Dobрева
<i>spaw</i>	unbekannt	SpeI	T3	<i>Antisense</i>	Labor Aanstad
<i>vmhc</i>	pGEM-T	NotI	T7	<i>Antisense</i>	Labor Stainier, Yelon <i>et al.</i> , 1999

Zur Generierung des Plasmids für die Synthese der *cfl2*-Sonde wurde ein 853 bp-Fragment amplifiziert, das sich aus dem größten Teil der kodierenden Sequenz für das Zebrabärblingprotein Cofilin 2 und seiner 3'-UTR (untranslatierte Region) zusammensetzt. Dieses Amplifikationsprodukt wurde in den pJET1.2/blunt-Vektor subkloniert. Aufgrund seiner Orientierung in dem Vektor wurde dieser für die Synthese der *Sense*-Sonde eingesetzt. Für die Herstellung der *Antisense*-Sonde wurde das *cfl2*-Fragment in den eukaryotischen Expressionsvektor pCS2+ umkloniert.

5.1.6. *In vitro*-Transkription

Zur Generierung der *cfl2*-mRNA wurde das „*mMessage mMachine* Sp6“-Kit verwendet. Hierfür wurde die kodierende Sequenz von Cofilin 2 zunächst in den pCDNA3-FLAG-HA-Vektor kloniert. Da sich der pCS2(+)-Vektor für die mRNA-Synthese besser eignet, wurde anschließend *cofilin 2* mit N-terminaler FLAG-HA-Sequenz in diesen Expressionsvektor subkloniert. Der pCS2(+)-Vektor besitzt eine Poly(A)-Sequenz, die bei der *in vitro*-Transkription der mRNA angehängt wird. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym Not I linearisiert und einer Phenol-Chloroform-Reinigung (siehe 5.1.7.) unterzogen. Das linearisierte Plasmid diente als Matrize für die *in vitro*-Transkription, deren Reaktionsansatz sich wie folgt zusammensetzte:

6 µl linearisierte Plasmid-DNA (1 µg)
10 µl 2x NTP/CAP
2 µl 10x Reaktionspuffer
2 µl Sp6-Enzym-Mix

Dieser 20 µl-Reaktionsansatz wurde zwei Stunden und nach Zugabe von 1 µl TURBO DNase für weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Der synthetisierten RNA mit angehängtem Poly(A)-Schwanz wurden 30 µl ddH₂O und 30 µl Lithiumchlorid zugesetzt. Daraufhin erfolgte die Fällung der RNA über Nacht bei -20 °C, gefolgt von einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13300 rpm und 4 °C. Die gefällte RNA wurde mit kaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, luftgetrocknet und in 30 µl ddH₂O resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung der gewonnenen RNA erfolgte am Nanodrop und deren Lagerung bei -80 °C.

5.1.7. Phenol-Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Die Reinigung der verdauten Plasmid-DNA wurde in einem Volumen von 200 µl durchgeführt. Nach Zugabe des gleichen Volumens des Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 13300 rpm zur Beschleunigung der Phasentrennung. Die obere, wässrige und nukleinsäurehaltige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zur Beseitigung von Phenolresten wurde erneut mit dem gleichen Volumen an Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Anschließend wurden die Nukleinsäuren nach Zugabe von 2,5-fachem Volumen Ethanol und $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (pH=5) über Nacht bei -20 °C gefällt und durch 20-minütige

Zentrifugation bei 13300 rpm und 4 °C sedimentiert. Zur Eliminierung der Salze wurde das Präzipitat mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl ddH₂O gelöst.

5.1.8. BrdU-Proliferationstest

Bei Bromdesoxyuridin (BrdU) handelt es sich um ein chemisches Uridin-Analogon, das während der Replikation in die neu synthetisierte DNA inkorporiert wird. Mit dem anti-BrdU-Antikörper können proliferierende Zellen detektiert werden. Für den Nachweis der Proliferationsrate in Zebrafischembryonen wurde die transgene Linie *Tg(-5.1myl7:nDsRed2)^{f2}* verwendet. Die Embryonen wurden hierfür im 21-Somitenstadium in eine 12-Wellplatte überführt (15 Embryonen pro Well). Die in DMSO hergestellte einmolare BrdU-Stammlösung wurde in E3-Medium auf eine Endkonzentration von 10 mM verdünnt. Nach Zugabe von 2 ml der verdünnten BrdU-Lösung schloss sich eine Inkubation im 28 °C-Brutschrank an, bis die Embryonen das 28 hpf-Stadium erreichten. Nach der BrdU-Inkorporation wurden die 28 hpf alten Embryonen in eine Petrischale (Ø 10 cm) überführt, in E3-Medium bei 28 °C inkubiert und bei 48 hpf in 4 %-igem PFA bei 4 °C über Nacht fixiert. Die fixierten Embryonen konnten nach dem Dehydrieren in einer aufsteigenden Methanolreihe (25 %, 50 % und 75 % in PBT, jeweils 5 min) in 100 %-igem Methanol bei -20 °C gelagert werden. Die Embryonen wurden langsam und schrittweise in einer absteigenden Methanolreihe (75 %, 50 % und 25 % in PBT, jeweils 15 min) rehydriert und in 5 mg/ml Pronase für 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Zur Denaturierung der DNA erfolgte eine einstündige Inkubation in 2 M HCl bei 37 °C. Abgesehen von der De- und Rehydrierung folgten jedem Schritt drei Waschungen für jeweils 5 min in PBT. Zur Visualisierung der proliferierenden Zellen wurde die BrdU-Immunfluoreszenzfärbung (siehe 5.4.5.) durchgeführt, bei der der sekundäre Antikörper anti-Ratte Alexa Fluor 488 verwendet wurde.

5.1.9. TUNEL

Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde die TUNEL- (engl.: *terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) Methode angewendet. Hierfür wurden *Tg(sox17:GFP)^{s870}* Embryonen im *Bud*-Stadium in 4 %-igem PFA bei 4 °C über Nacht fixiert, in aufsteigender Methanolreihe (siehe 5.1.8.) dehydriert und in 100 %-igem Methanol bei -20 °C gelagert. Zur Permeabilisierung der rehydrierten Embryonen (Rehydrierung in

absteigender Methanolreihe, siehe 5.1.8.) erfolgte eine fünfminütige Inkubation in Tris-EDTA-Lösung bei 95 °C. Da bei diesem Schritt das GFP-Protein denaturierte, wurde zur Visualisierung der *sox17*-exprimierenden Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-GFP-Antikörper (siehe 5.4.5.) durchgeführt. Um die gefärbten Embryonen weiter zu permeabilisieren, wurden diese 15 min in 10 µg/ml Proteinase K (in PBT verdünnt) bei 30 °C inkubiert und anschließend in 4 %-igem PFA für 20 min bei RT nachfixiert. Für die Markierung der DNA-Bruchstellen apoptotischer Zellen wurde das „*In Situ Cell Death Detection*“-Kit eingesetzt. Dazu wurde die Färbelösung mit der Enzymlösung in einem Verhältnis von 9:1 gemischt, den Embryonen hinzugefügt und diese wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Abgesehen von der De- und Rehydrierung folgten jedem Schritt drei Waschungen für jeweils 5 min in PBT. Zudem fanden alle Schritte nach der GFP-Immunfluoreszenzfärbung unter Ausschluss des Lichtes statt.

5.2. Mikrobiologische Methoden

5.2.1. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Die Transformation der Bakterien erfolgte nach der Hitzeschock-Methode. Hierfür wurden 50 µl chemisch kompetente *E. coli* Top10-Zellen mit dem kompletten 10 µl-Ligationsansatz (siehe 5.1.2.) gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Dem Hitzeschock im 42 °C-Wasserbad für 45 sec schloss sich eine zweiminütige Inkubation auf Eis an. Nach der Zugabe von 500 µl vorgewärmtem LB-Medium folgte eine einstündige Erholungsphase der Zellen bei 37 °C unter leichtem Schütteln (200 rpm). Die Zellen wurden anschließend zur Selektion auf Antibiotika-haltigem LB-Agar ausplattiert. Am nächsten Tag wurden einige Klone gepickt, 3 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Selektionsmarker angeimpft und über Nacht im 37 °C Schüttler inkubiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 10000 rpm wurden die Plasmide aus den sedimentierten Bakterien mittels Mini-Präparation aufgereinigt („*NucleoSpin Plasmid*“-Kit nach Herstellerangaben). Die daraus gewonnenen Plasmide wurden durch asymmetrische Restriktion und Sequenzierung auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts untersucht. Zur Lagerung der Bakterien wurden aus den Flüssigkulturen Stammlösungen hergestellt, indem 800 µl der jeweiligen Kultur mit 200 µl sterilem 100 % Glycerin vermischt, in flüssigem Stickstoff und anschließend bei -80 °C eingefroren wurden.

5.3. Zellbiologische Methoden

5.3.1. Kultivierung und transiente Transfektion von HEK293T Zellen

Die Kultivierung von HEK293T-Zellen erfolgte im Nährmedium DMEM (engl.: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit 10 % fetalem Kälberserum sowie 0,1x Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂. Je nach Konfluenz wurden die Zellen nach zwei bis drei Tagen passagiert. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit sterilem PBS gewaschen und durch die Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden gelöst und vereinzelt. Die enzymatische Reaktion wurde nach etwa 5 min mit dem Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 3 min pelletiert und in frischem Kulturmedium aufgenommen.

Für die transiente Transfektion wurden 1×10^6 Zellen pro Petrischale (Ø 10 cm) ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Zellen 50-70 % konfluent. Die Transfektion erfolgte mittels Polyethylenimin (PEI), einem kationischen, stark verzweigten Polymer. Hierfür wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 180 µl sterilem PBS vermischt. Zu der Plasmidlösung wurden anschließend bei simultanem Vortexen 216 µl 1,67 mM PEI (in PBS) tropfenweise zugegeben. Nach dem Vortexen für weitere 5 sec erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur, gefolgt von der Verteilung des kompletten Transfektionsansatzes auf den Zellen. Der zweitägigen Inkubation bei 37 °C schloss sich die Ernte der transfizierten Zellen für die Proteinextraktion an.

5.4. Entwicklungsbiologische Methoden

5.4.1. Haltung und Züchtung der Zebrafische

Die Zebrafische wurden in einem geschlossenen Aquariensystem der Firma TECNIPLAST gehalten. Die Aufzucht, Haltung, Fütterung und Verpaarung der Zebrafische geschah nach den Angaben in „*The Zebrafish Book*“ (Westerfield, 2000). Am Vorabend der Injektion wurden die Zebrafische paarweise in Ablachkammern umgesetzt, wobei Männchen und Weibchen durch ein Gitter voneinander getrennt waren. Am nächsten Morgen wurde durch das Entfernen des Gitters das Paarungsritual gestartet. Die befruchteten Eier wurden geerntet und in E3-Medium bei 28 °C gehalten. Die Entwicklungsstadien wurden nach Kimmel *et al.* (2005) bestimmt.

5.4.2. Mikroinjektion

Für eine transiente Geninaktivierung wurden in dieser Arbeit die Morpholinos eingesetzt. Bei Morpholinos handelt es sich um chemisch modifizierte Nukleinsäure-Analoga, die aus etwa 25 Basen bestehen. An die Stelle des Riboserings tritt bei diesen Nukleinsäure-Analoga ein Morpholinoring, der sich durch ein zusätzliches Amin im Vergleich zur Ribose auszeichnet. Dieses ersetzt das Sauerstoffatom und neutralisiert den geladenen Phosphodiester eines typischen Oligonukleotids. Der Verlust der negativen Ladung hat den Vorteil, dass es zu keinen unspezifischen Interaktionen mit positiv geladenen Gruppen anderer Nukleinsäuren oder von Proteinen kommen kann. Die Basen bleiben unmodifiziert, so dass die üblichen Basenpaar-Reaktionen ablaufen können. Die Morpholinos binden mit hoher Affinität sehr spezifisch an komplementäre RNA. Sie sind stabil gegen Nukleasen und lösen keine Immunreaktion aus (Eisen und Smith, 2008). Bei der Morpholino-basierten Geninaktivierung handelt es sich um einen *Knockdown* und keinen *Knockout*. Die Konzentration des injizierten Morpholinos nimmt mit dem Wachstum des Embryos ab, so dass sich der inhibitorische Effekt schließlich aufhebt. Im Gegensatz zum *Knockout* wird das Genom nicht verändert, und die Inhibition dauert nur bis zum dritten Tag der Entwicklung an. Organismen, in denen die Genexpression durch Morpholinos modifiziert wird, werden als Morphanten und nicht als Mutanten bezeichnet (Ekker, 2000).

Die Mikroinjektion erfolgte mit speziellen Injektionsnadeln, die aus Glaskapillaren mit einem *Micropipette Puller* gezogen wurden. Die in ddH₂O gelösten Morpholinos (siehe 4.10.) mit einer Konzentration von 1 mM wurden für die Mikroinjektion 1:3 (*cfl2*-ATG-, *isl1*-Spl- und *alcama*-ATG-Morpholino), 1:4 (*cfl2*-Spl-Morpholino) bzw. 1:20 (*integrin-αV1*-Morpholino) in ddH₂O verdünnt und mit 10 % Phenolrot versetzt. Zur Vermeidung von Sekundärstrukturen wurden die Morpholinoverdünnungen 10 min bei 65 °C inkubiert. Zur besseren Stabilität der *cfl2*-mRNA wurde diese in 0,1 M KCl 1:25 verdünnt. Um das Risiko einer RNase-Kontamination gering zu halten, wurde in diesem Fall auf die Zugabe von Phenolrot verzichtet. Die Füllung der Injektionsnadel erfolgte mit Hilfe von *Microloader* Pipettenspitzen. Die Spitze der gefüllten Injektionsnadel wurde mit einer Rasierklinge abgeschnitten, so dass der austretende Tropfen das gewünschte Volumen hatte. Das Volumen der injizierten Lösung wurde mit Hilfe eines Objektmikrometers ermittelt. Aus der Konzentration der mRNA bzw. des Morpholinos ließ sich die injizierte Menge berechnen. Es wurden 20 pg *cfl2*-mRNA, 9 ng *cfl2*-ATG-, 5 ng *cfl2*-Spl-, 8 ng *alcama*-ATG- und 9 ng *isl1*-Spl-

Morpholino injiziert. Für einen nahezu kompletten Verlust der *integrin- α V1*-Expression waren 0,8 ng Morpholino erforderlich (Ablooglu *et al.*, 2010). Für die Co-Injektion wurde diese Menge halbiert, so dass schließlich 0,4 ng *integrin- α V1*- und 4,5 ng *cfl2*-ATG-Morpholino injiziert wurden. Der globale *Knockdown* von *cfl2* erfolgte durch die Injektion des Morpholinos in den Dotter der Embryonen im 1- bis 2-Zellstadium. Für den DFC-spezifischen *Knockdown* war die Injektion von 5 ng *cfl2*-ATG-Morpholino ausreichend, die in den Dotter der Blastula (256-1000-Zellstadium; 2,5-3 hpf) erfolgte. In diesem zeitlichen Rahmen sind die meisten zytoplasmatischen Brücken geschlossen, mit der Ausnahme der DFCs, die weiterhin mit der Dotterzelle verbunden bleiben (Amack und Yost, 2004). Zur Visualisierung der Morpholino-Verteilung innerhalb des Embryos, wurde dieses mit 10 % Rhodamin-Dextran anstelle von Phenolrot vermischt. Um die *cfl2*-Expression ausschließlich im Dotter zu inhibieren, fand die Morpholinoinjektion in die Dotterkugel bei 4 hpf statt. In dieser Entwicklungsphase sind auch die Zytoplasmabrücken zwischen dem Dotter und den DFCs geschlossen. Für die Überexpressionsstudien wurde die *cfl2*-mRNA direkt in die Zelle der Zygote injiziert.

Zum Ausrichten der Zebrafärblingeier für alle Injektionen diente eine dafür speziell hergestellte Agaroseplatte, in die mittels einer Schablone Rinnen eingedrückt wurden. Die darin aufgereihten Fischeier wurden mit Hilfe eines Druckluftinjektors injiziert. Nach dem Injektionsprozess wurden die Zebrafärblingeier in 1x E3-Medium mit 0,1 %-igem Methylenblau, das fungizid und bakterizid wirkt, im 28 °C-Brutschrank gehalten. Um die Pigmentierung der Embryonen zu Dokumentationszwecken zu unterdrücken, wurde dem E3-Medium am zweiten Tag in einer Endkonzentration von 0,003 % PTU zugegeben. Vor der Fixierung oder der chemischen Behandlung der Embryonen wurde das Chorion entweder manuell mit zwei Pinzetten entfernt oder enzymatisch durch die Zugabe von Pronase. Für die enzymatische Dechorionierung wurde zunächst eine 5 mg/ml Stammlösung der Pronase in 1x E3-Medium ohne Methylenblau angesetzt, die schließlich ca. 1:100 verdünnt dem E3-Medium beigefügt wurde. Der Verdau erfolgte über Nacht bei 28 °C.

5.4.3. Injektion der fluoreszierenden Beads

Zur Visualisierung des Zilienschlages wurden die Zebrafärblingembryonen zwischen dem 6- und 10-Somitenstadium dechorioniert und in einprozentiger *Low-Melting*-Agarose mit posteriorem Ende nach oben eingebettet. Die fluoreszierenden Beads (*Fluoresbrite Plain Red*

0,5 µm) wurden 1:50 in ddH₂O verdünnt und mit Hilfe des Druckluftinjektors direkt in das Kupffersche Vesikel injiziert. Die Motilität der Beads wurde mit dem an das Fluoreszenzmikroskop angebrachten HD-Camcorder bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

5.4.4. Behandlung der Zebrabärblingembryonen mit Cytochalasin D und Latrunculin B

Bei Cytochalasin D und Latrunculin B handelt es sich um Membran-permeable Toxine, die die Polymerisation von Aktinmonomeren inhibieren. Von Cytochalasin D wurde eine 20 mM und von Latrunculin B eine 10 mM Stammlösung in DMSO hergestellt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Die Zebrabärblingembryonen wurden im 21-Somitenstadium in eine 12-Wellplatte transferiert (etwa 25 Embryonen pro Well) und in mit einem der beiden Inhibitoren versetzten E3-Medium bei 28 °C inkubiert. Die Exposition mit Cytochalasin D bzw. Latrunculin B erfolgte mit einer Endkonzentration von 20 µM bzw. 2 µM. Um jegliche Effekte des Lösungsmittels auf die kardiale Morphogenese auszuschließen, wurden DMSO-Kontrollen mitgeführt. Die Konzentration von DMSO in den Kontrollen entsprach der DMSO-Konzentration in den Cytochalasin D- bzw. Latrunculin B-Behandlungen. Die behandelten Embryonen wurden bei 48 hpf in 4 %-igem PFA fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung (siehe 5.4.5.) mit anti-DsRed- und S46-Antikörper unterzogen.

5.4.5. Immunfluoreszenz-, TO-PRO-3- und Rhodamin-Phalloidin-Färbung

Die Zebrabärblingembryonen wurden in den gewünschten Entwicklungsstadien in 4 %-igem PFA über Nacht bei 4 °C fixiert. In einer aufsteigenden Methanolreihe (siehe 5.1.8.) wurden die Embryonen dehydriert und in purem Methanol bei -20 °C bis zu mehreren Wochen gelagert. Bei Bedarf wurden die Embryonen langsam in einer absteigenden Methanolreihe (siehe 5.1.8.) rehydriert, in PBST für 5 min gewaschen und eine Stunde in Blockierlösung bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Der Primärantikörper (siehe 4.5.) wurde in der Blockierlösung verdünnt und die Embryonen wurden über Nacht bei 4 °C auf der Wippe inkubiert. Nach drei Waschschritten in PBST für jeweils 15 min folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (verdünnt 1:500 in Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C auf der Wippe. Anschließend wurden die Embryonen dreimal jeweils 15 min in PBST gewaschen und standen schließlich der konfokalen Mikroskopie zur Verfügung. Die Detektion der

atypischen Proteinkinase C (aPKC, PKC ζ) sowie von Pan-Cadherin erforderte eine zusätzliche Permeabilisierung der Embryonen. Diese erfolgte nach dem Rehydrierungsschritt durch die Inkubation in Tris-EDTA-Lösung bei 95 °C für 5 min. TO-PRO-3 wurde 1:2000 in der Blockierlösung verdünnt und zusammen mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Für die Visualisierung der Aktinfilamente wurde die Rhodamin-Phalloidin-Färbung im Anschluss an die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Hierfür wurden die Embryonen für 5 min in PBS-DT gewaschen und mit Rhodamin-Phalloidin (verdünnt 1:75 in PBS-DT) für 30 min bei Raumtemperatur wippend inkubiert. Daraufhin erfolgten zwei Waschschriffe zunächst in PBS-DT für 5 min und dann in PBS für weitere 5 min.

5.4.6. *Whole Mount in situ*-Hybridisierung (WISH)

Die *Whole Mount in situ*-Hybridisierung (WISH) ermöglicht es spezifische Gentranskripte im ganzen Organismus nachzuweisen. Um das Risiko einer Kontamination mit RNasen zu minimieren, wurden alle Lösungen mit DEPC behandeltem Wasser präpariert. Die Embryonen wurden im gewünschten Stadium in 4 %-igem PFA über Nacht bei 4°C fixiert. Fixierte Tiere wurden zweimal in PBS gewaschen, in 100%-igem Methanol dehydriert und bei -20 °C gelagert. Bei Bedarf wurden die Embryonen in absteigender Methanolreihe (siehe 5.1.8.) rehydriert und anschließend zweimal in PBT gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden die Embryonen mit 10 mg/ml Proteinase K (in PBT verdünnt) bei Raumtemperatur verdaut. Die Verdauzeit richtete sich dabei nach dem Stadium der Tiere. Bis 24 hpf war keine Proteinase K-Behandlung notwendig, 36 hpf alte Embryonen wurden 5 min und Embryonen ab 48 hpf 20 min permeabilisiert. Nach kurzem Waschschrift in PBT folgte eine 20-minütige Fixierung in 4 %-igem PFA, die durch erneutes Waschen in PBT abgestoppt wurde. Zur Acetylierung basischer Amminogruppen erfolgten zwei 5-minütige Behandlungen mit 0,25 %-igem Essigsäureanhydrid in 0,1 M Triethanolamin (pH=8,0). Nach zwei Waschschriffen in PBT wurden die Embryonen zweimal jeweils 5 min in 500 μ l Hybridisierungspuffer gewaschen und anschließend zur Vorbereitung auf die Hybridisierung mindestens drei Stunden ebenfalls in 500 μ l Hybridisierungspuffer bei 65 °C inkubiert. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbehandlung der DIG-markierten Sonden (siehe 5.1.5.). Hierzu wurden diese in der Hybridisierungslösung auf eine Endkonzentration von 2 μ g/ml in einem Gesamtvolumen von 200 μ l verdünnt. Anschließend wurden die Sonden 10 min bei 85 °C denaturiert und dann bei 65 °C für weitere 10 min inkubiert. Nach der Zugabe der Sonden zu

den Embryonen fand die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C im Wasserbad statt. Zur Beseitigung der überschüssigen Sonden wurden die Embryonen am nächsten Tag zweimal für jeweils 30 min in der auf 65 °C vorgewärmten Lösung 1 gewaschen. Anschließend folgten doppelte Waschschrte in vorgewärmten SSC-Lösungen bei 65 °C: 15 min in 2x SSC und 20 min in 0,2x SSC. Daraufhin wurden die Embryonen für 10 min bei Raumtemperatur in MABT umgepuffert und in 2x Blockierungslösung für 2 Stunden inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu minimieren. Die Inkubation mit dem alkalischen Phosphatase- (AP) konjugierten anti-DIG-Antikörper erfolgte in einer 1:2000 Verdünnung über Nacht bei 4 °C. Zur Inhibierung endogener alkalischer Phosphatasen und somit zur Reduktion des Hintergrunds, wurde am nächsten Tag die Behandlung mit 2 mM Levamisol (in MABT) sechsmal für je 30 min durchgeführt. Die Detektion der gebundenen Sonden erfolgte durch die Zugabe von NBT/BCIP-Färbelösung (200 µl NBT/BCIP-Stammlösung auf 10 ml AP-Puffer). Die Farbreaktion fand lichtgeschützt bei Raumtemperatur statt und wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBT abgestoppt. Die Embryonen wurden bis zur Dokumentation in 4 % PFA bei 4°C gelagert. Bei Bedarf wurden die Embryonen anschließend in Methanol für mindestens 2 Stunden dehydriert und in einem Benzylalkohol-Benzoat-Gemisch (1:2; BBA) geklärt (engl.: *clearing*). Die Photodokumentation erfolgte in diesem Fall ebenfalls in BBA, ansonsten in 100 %-igem Glyzerin.

5.4.7. DAF-FM Markierung

DAF-FM-Diacetat ist ein membrangängiges, nicht fluoreszierendes Molekül, das durch intrazelluläre, unspezifische Esterasen gespalten wird. Das dabei entstehende DAF-FM (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Daifluorofluorescein) ist ein membranundurchlässiger, schwacher Fluoreszenzfarbstoff, der sensitiv für Stickstoffmonoxid (NO) ist. Erst nach NO-Bindung bildet sich das fluoreszierende Benzotriazol-Derivat (Haugland, 2005; Abb. 52). Dieser Fluoreszenzindikator für das endotheliale Stickstoffmonoxid diente dem Nachweis der glatten Muskelzellen des Bulbus Arteriosus. Hierfür wurde zunächst eine 5 mM DAF-FM-Diacetat-Stammlösung in DMSO angesetzt und bei -20 °C gelagert. Für die NO-Detektion wurden *Tg(myl7:mCherry-HsHRAS)^{sd21}* Embryonen drei bzw. vier Tage nach der Fertilisation (engl.: *days post fertilization*, dpf) in eine 12-Wellplatte überführt (20 Embryonen pro Well). Nach Zugabe des in E3-Medium gelösten 10 µM DAF-FM-Diacetats (pH=7,0) erfolgte eine vierstündige, lichtgeschützte Inkubation bei 28 °C. Anschließend wurden die markierten

Embryonen lebend oder nach der Fixierung in 4 %-igem PFA unter dem konfokalen Mikroskop untersucht.

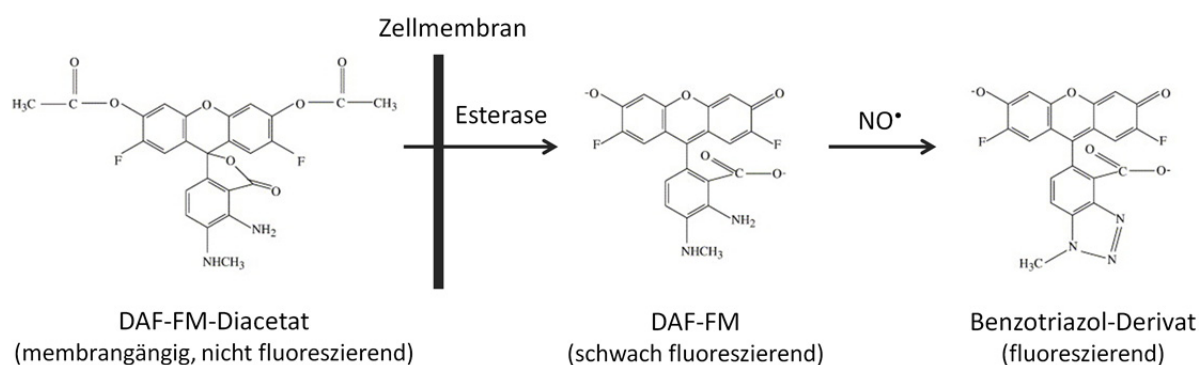


Abbildung 52. Reaktionsschema für die NO-Detektion durch DAF-FM.

DAF-FM Diacetat wird durch intrazelluläre Esterasen zu DAF-FM umgewandelt, das in Verbindung mit Stickstoffmonoxid (NO) das fluoreszierende Benzotriazol-Derivat bildet. Modifiziert nach Bartosz, 2006.

5.4.8. Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie diente der Detektion von fluoreszierenden Proteinen innerhalb gefärbter oder lebender, transgener Zebrafischembryonen. Für die Untersuchung an dem konfokalen Mikroskop LSM 710 von Zeiss wurden die Embryonen in einprozentiger *Low-Melting*-Agarose eingebettet. Lebende Embryonen wurden vorher in Tricain anästhesiert. Für die Aufnahme des Herzens gefärbter Embryonen wurde dieses freigelegt, indem der Kopf und das Perikard mit einer feinen Pinzette abgezogen wurden; das Herz lag dabei auf dem Dotter. Die eingebetteten Embryonen wurden in ddH₂O bei 40-facher Vergrößerung gescannt. Übersichtsbilder von Embryonen wurden mit dem Stereomikroskop MZ 16 FA von Leica aufgenommen.

5.5. Proteinchemische Methoden

5.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse erfolgte durch die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Zebrafischproteine Alcama und Cofilin 2 besitzen ein Molekulargewicht von jeweils 72 kDa und 18 kDa und wurden in einem 14 %-igen Trenngel separiert. Die Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels war wie folgt:

Komponente	Sammelgel (3 %)	Trenngel (14 %)
ddH ₂ O	5,3 ml	6,2 ml
40 % Acrylamid	600 µl	5,6 ml
4x Sammelgelpuffer	2 ml	-
4x Trenngelpuffer	-	4 ml
6 % APS	80 µl	160 µl
TEMED	8 µl	16 µl

Um die Effizienz des *Knockdowns* durch das *cf12*-ATG-Morpholino oder der Translation der injizierten *cf12*-mRNA zu untersuchen, wurden zwei bis vier Zebrafärbryonen (48 hpf) dechorioniert, vom Dottersack befreit, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für die SDS-PAGE wurden die auf Eis aufgetauten Embryonen mit 10 µl Homogenisierungspuffer und 10 µl 4x SDS-PAGE-Puffer versetzt und mit Hilfe einer Pipette mechanisch grob aufgeschlossen. Das Lysat wurde im Eisbad des Bioruptors auf höchster Stufe sonifiziert (dreimal jeweils 30 sec und 30 sec Pause). Nach der Sonifizierung wurden die Lysate bei 95 °C für 10 min denaturiert, kurz zentrifugiert, auf das SDS-Gel aufgetragen und in 1x Lämmli-Puffer bei 200 V aufgetrennt.

5.5.2. Western Blot (WB)

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran durch das Tank-Blot- (Wet-Blot) System bei 100 V für eine Stunde transferiert. Der Transfer der Proteine wurde mittels *Red Alert*-Färbung überprüft. Nach dem Entfärben mit ddH₂O erfolgte eine einstündige Inkubation in der Blockierlösung bei Raumtemperatur auf der Wippe. Der Primärantikörper (siehe 4.5.) wurde in der Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C wippend inkubiert. Unspezifische Antikörperbindungen wurden in drei Waschschritten von je 10 min mit TBST reduziert. Die Membran wurde daraufhin mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (siehe 4.5.), der in der Blockierlösung 1:1000 verdünnt wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Den folgenden drei Waschschritten (dreimal je 10 min in TBST) schloss sich die Detektion des Proteins mit einem Chemilumineszenz-basierten System (SuperSignal West Femto Substrat von Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers an. Zur Dokumentation wurde der LAS-4000 *Luminescence Imager* verwendet.

5.5.3. Strippen von WB-Membranen

Western Blots können nacheinander mit mehreren Antikörpern inkubiert und entwickelt werden. Dafür müssen die bereits vorhandenen Antikörper beseitigt werden. Zu diesem Zweck erfolgte die Denaturierung der gebundenen Antikörper bei saurem pH-Wert. Hierfür wurde die Membran zunächst in *Stripping*-Lösung 1 für 10 min und in *Stripping*-Lösung 2 für weitere 10 min inkubiert. Nach der 10-minütigen Neutralisierung in *Stripping*-Lösung 3 folgte das Blocken, bevor erneut ein Antikörper zugesetzt werden konnte.

5.5.4. Immunpräzipitation

Für die Proteinextraktion aus den 50 hpf alten Zebrafärbryonen wurde bei diesen zunächst mit einer 100 µl-Pipette der Dottersack abgesaugt. Etwa 100 Embryonen wurden anschließend in 100 µl mit Protease-Inhibitoren versetztem Homogenisierungspuffer lysiert und auf Eis sonifiziert (dreimal jeweils 30 sec und 30 sec Pause). Dem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 10000 g und 4 °C schloss sich die Proteinkonzentrationsbestimmung des Überstandes mittels des Bradford-Reagenzes an. Dabei wurden 2 µl des Proteinextraktes mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt. Nach einer fünfminütigen Inkubation erfolgte eine spektrometrische Messung der Extinktion bei 595 nm. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichreihe ermittelt. Für die Immunpräzipitation wurde 1 mg der extrahierten Proteine mit 5 µg zn-8 Antikörper in einem Gesamtvolumen von 500 µl über Nacht bei 4 °C wippend inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Protein G Sepharose-Beads zu dem Protein-Antikörper-Komplex erfolgte eine Inkubation für weitere vier Stunden bei 4 °C auf der Wippe. Die unspezifischen Proteinbindungen wurden durch die folgenden fünf Waschschrte mit jeweils 1 ml Homogenisierungspuffer minimiert. Dabei wurden die 1,5 ml Reaktionsgefäße vorsichtig und kurz invertiert und bei 800 g und 4 °C für eine Minute pelletiert. Die Elution der präzipitierten Proteine erfolgte durch die Inkubation der Beads mit 30 µl 4x SDS Auftragspuffer bei 95 °C für 10 min. Die eluierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und einer massenspektrometrischen Analyse (siehe 5.5.6.) unterzogen.

5.5.5. Co-Immunpräzipitation

Für die Proteinextraktion wurden transfizierte HEK293T-Zellen (siehe 5.3.1) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß transferiert und in 500 µl mit Protease-Inhibitoren versetztem Homogenisierungspuffer auf Eis sonifiziert (dreimal jeweils 30 sec und 30 sec Pause). Einem fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 10000 g und 4 °C schloss sich die Proteinkonzentrationsbestimmung des Überstandes nach der Bradford-Methode an (siehe 5.5.4.). Für die Co-Immunpräzipitation wurden 800 µg Proteinextrakt mit 5 µg zn-8 Antikörper in einem Gesamtvolumen von 500 µl über Nacht bei 4 °C wippend inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl Protein G Sepharose-Beads zu dem Protein-Antikörper-Komplex erfolgte eine Inkubation für weitere vier Stunden bei 4 °C auf der Wippe. Die Waschschrte und die Elution wurden wie in 5.5.4. beschrieben durchgeführt. Die präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (siehe 5.5.1.) aufgetrennt und der Western Blot-Analyse (siehe 5.5.2.) unterzogen.

5.5.6. Massenspektrometrie

Nach der Immunpräzipitation (siehe 5.5.4.) wurden die präzipitierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit dem kolloidalen Farbstoff Coomassie Blue G250 im Polyacrylamidgel angefärbt. Um das Risiko der Kontamination mit Kreatin zu minimieren, wurden für die SDS-PAGE die kommerziell erwerblichen NuPAGE Bis-Tris Gradientengele (4-12 % Polyacrylamid) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Färbung mit dem anionischen Farbstoff Coomassie Blue G250, der nicht-kovalente Bindungen mit basischen Aminosäuren eingeht, erfolgte mit dem „Colloidal Blue Staining“-Kit von Invitrogen nach dem Protokoll des Herstellers. Um die Proteine der Massenspektrometrie zugänglich zu machen, wurde ein In-Gel-Verdau durchgeführt. Dabei erfolgte die Reduktion und Alkylierung von Cysteinen, die enzymatische Spaltung mit der Serinprotease Trypsin sowie mehrfache Extraktion der generierten Peptide. Die Durchführung wurde detailliert in der Dissertation von Anne Konzer (2012) und in ihrer veröffentlichten Studie (Konzer *et al.*, 2013) beschrieben. Mit der Massenspektrometrie (MS) wurden durch das detektierte Masse-zu-Ladung-Verhältnis der positiv geladenen Peptide die dazugehörigen Proteine identifiziert. Zur Ermittlung der Interaktionspartner von Alcama wurde die Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) eingesetzt. Die massenspektrometrische Messung und Auswertung wurde in der Service-

Gruppe des Max-Planck-Instituts in Bad Nauheim unter der Leitung von Marcus Krüger durchgeführt.

5.6. Bioinformatische Methoden

5.6.1. Verwendete Programme

Genomische DNA- und cDNA-Sequenzen von *Danio rerio* entstammen der Zebrafisch-Datenbank ZFIN (<http://zfin.org>). Für Sequenzvergleiche wurden die Datenbanken NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) und ENSEMBL (<http://www.ensembl.org>) herangezogen. Zur Analyse von DNA-Sequenzen wurde das Programm NEBcutter (Version 2.0; <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) verwendet. Zur statistischen Analyse wurde der zweiseitige t-Test eingesetzt. Mit der Software GraphPad Prism wurde der p-Wert ermittelt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Bildbearbeitung erfolgte unter Verwendung des Programms Adobe Photoshop. Für Primer-Designs wurde das Programm Clone Manager Professional 9 herangezogen. Die Ermittlung des Durchmessers, der Anzahl und Länge der Zilien des Kupfferschen Vesikels, sowie die räumliche Verfolgung einzelner Beads und die Quantifizierung von Kardiomyozyten (siehe 5.6.2.) erfolgte mit Hilfe der ImageJ Software.

5.6.2. Quantifizierung der Kardiomyozyten

Bei der konfokalen Mikroskopie (siehe 5.4.8.) wurde das Zebrafischherz in einen Stapel optischer, konfokaler Schnittebenen (durchschnittlich 200 Schnitte) zerlegt. Mit Hilfe der ImageJ Software konnten Z-Projektionen aus 10 bis 20 optischen Schnitten, je nach Dichte der Zellkerne im jeweiligen Herzabschnitt, erzeugt werden. Anschließend wurden die einzelnen Projektionen vereinigt und die Zellkerne quantifiziert. Auf diese Weise konnte die Zahl aller Kerne erfasst werden, ohne diese doppelt zu zählen.

ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
° C	Grad Celcius
∅	Durchmesser
μ	Mikro-
Abb.	Abbildung
ABPs	Aktin-bindende Proteine
ADF	Aktin-depolymerisierender Faktor
ADP	Adenosindiphosphat
Aip1	engl.: <i>actin-interacting protein 1</i>
Alcam	engl.: <i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
ALPM	anterolaterales Plattenmesoderm
AMHC	Atrium-spezifische schwere Myosinkette (engl.: <i>atrial myosin heavy chain</i>)
AP	alkalische Phosphatase
aPKC; PKCζ	atypische Protein Kinase C; Protein Kinase Zeta
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARP2/3	engl.: <i>actin-related protein 2/3</i>
ATG	Adenin, Thymin, Guanin; ein Start-Codon
ATP	Adenosintriphosphat
BBA	Benzylbenzoat-Benzylalkohol
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BEN	engl.: <i>bursal epithelium and neurons</i>
BMP	knochenmorphogenetisches Protein (engl.: <i>bone morphogenetic protein</i>)
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
c	Zenti-
C	konstante
Ca ²⁺	Calcium-Ion
CaMK-II	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CD166, 34, 6	engl.: <i>cluster of differentiation 166, 34, 6</i>
Cdc42	engl.: <i>cell division cycle 42</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
Celsr1	engl.: <i>cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 1</i>
Cerl2	engl.: <i>cerberus like 2</i>
cfl2	<i>cofilin 2</i>
CIB1	Calcium- und Integrin-bindendes Protein 1
CIN	Chronophin
CytD	Cytochalasin D
Daam1	engl.: <i>Dvl-associated activator of morphogenesis 1</i>

DAF-FM	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Daifluorofluorescein
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEL	Tiefenzellen (engl.: <i>deep cell layer</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFCs	engl.: <i>dorsal forerunner cells</i>
DIG	Digoxigenin
DMEM	engl.: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DM-GRASP	engl.: <i>immunoglobulin-like restricted axonal surface protein expressed in the dorsal funiculus and ventral midline of the chick spinal cord</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dpf	Tage nach der Befruchtung (engl.: <i>days post fertilization</i>)
DRFs	engl.: <i>diaphanous-related formins</i>
DsRed	engl.: <i>red fluorescent protein of Discosoma sp.</i>
DTT	Dithiothreitol
DVL	Dishevelled
E	Embryonaltag
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	engl.: <i>enhanced green fluorescent protein</i>
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
engl.	Englisch
<i>et al</i>	<i>et alii</i>
EVL	Hüllschicht (engl.: <i>enveloping layer</i>)
FAK	fokale Adhäsionskinase
F-Aktin	filamentöses Aktinpolymer
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: <i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (engl.: <i>fibroblast growth factor</i>)
FHF	erstes Herzfeld (engl.: <i>first heart field</i>)
flk1	engl.: <i>fetal liver kinase 1</i>
foxa1	engl.: <i>forkhead box protein A1</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G-Aktin	globuläres Aktinmonomer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEFs	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren (engl.: <i>guanine nucleotide exchange factors</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl.: <i>green fluorescent protein</i>)
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl.: <i>G-protein-coupled receptor</i>)
GTP	Guanosintriphosphat

HA	Hämagglutinin des Influenzavirus A
HCl	Salzsäure
H-FABP	engl.: <i>heart-type fatty acid binding protein</i>
hpf	Stunden nach der Befruchtung (engl.: <i>hours post fertilization</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HsHRAS	engl.: <i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
ILK	engl.: <i>integrin-linked kinase</i>
<i>intaV</i>	<i>integrin-αV1</i>
IP	Immunpräzipitation
Isl1	Islet 1
iv	<i>Inversus-Viscerum</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kdrl	engl.: <i>kinase insert domain receptor like</i>
KIF	Kinesin-Superfamilie
Ktr	Kontrolle
KV	Kupffersches Vesikel
LatB	Latrunculin B
LIM	erstmals in Lin-11, Isl1, Mec-3 beschriebene Domäne
LIMK	LIM-Domäne Kinase
LPM	laterales Plattenmesoderm
Lrd	Links-Rechts-Dynein
Ltbp3	latentes TGF β -Bindeprotein 3
M	Molar
m	Milli-
MAB	Maleinsäurepuffer (engl.: <i>maleic acid buffer</i>)
MADS	erstmals in MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS, SRF beschriebene Domäne
mCherry	Cherry-Monomer
Mef2	engl.: <i>myocyte enhancer factor 2</i>
min	Minute(n)
mk	monoklonal
MO	Morphant
MRCK- α	engl.: <i>myotonic dystrophy kinase-related cdc-42-binding kinase-α</i>
mRNA	Boten-RNA (engl.: <i>messenger-RNA</i>)
MRTF	engl.: <i>myocardin-related transcription Factor</i>
MS	Massenspektrometrie
Mus	Maus
MuSC	engl.: <i>murine SC1-related protein</i>

myl7	leichte Myosinkette Polypeptid 7 (engl.: <i>myosin light chain polypeptide 7</i>)
n	Nano-
n	Anzahl der untersuchten Embryonen
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
N-Cadherin	neuronales Cadherin
NgCAM	neuronales Zelladhäsionsmolekül (engl.: <i>neuron-glia cell adhesion molecule</i>)
nk-Wnt	nicht-kanonischer Wnt-Signalweg
Nkx2.5	Nk2 Homöobox Transkriptionsfaktor 5
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
Ntl	No tail
NVPs	engl.: <i>nodal vesicular parcels</i>
p	Piko-
PAK	p21-aktivierte Kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
P-Cofilin	phosphoryliertes Cofilin/ADF
PCP	planarer Zellpolaritäts-Signalweg (engl.: <i>planar cell polarity</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
P _i	anorganisches Phosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
Pitx2	engl.: <i>pituitary homeobox 2</i>
pk	polyklonal
Pkd2	Polycystin-2
Poly(A)	Poly-Adenin
PTU	1-Phenyl-2-thiourea
RA	Retinsäure (engl.: <i>retinoic acid</i>)
Rho	Ras-Homologe Genfamilie
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
ROCKs	Rho-Kinasen
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse-Transkription
RTKs	Rezeptor-Tyrosinkinasen
SC1	Zelloberflächen-Antigen 1 (engl.: <i>cell surface antigen 1</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>dodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde

SHF	zweites Herzfeld (engl.: <i>second heart field</i>)
Shh	Sonic hedgehog
sox17	engl.: <i>Sry-related HMG- (high mobility group) box</i>
Spaw	Southpaw
Spl	Spleiß-
SRCR	engl.: <i>scavenger-receptor cysteine-rich</i>
SRF	engl.: <i>serum response factor</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat (engl.: <i>saline sodium citrate</i>)
SSH	Slingshot
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>TRIS-buffered saline</i>)
Tbx1	T-Box 1
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TESK	testikuläre Kinase
Tg	Transgen
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor- β (engl.: <i>transforming growth factor-β</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TUNEL	engl.: <i>terminal desoxynucleotidyl transferase- (TdT) mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
UTR	untranslatierte Region
V	variable
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
Vangl2	engl.: <i>van gogh-like 2</i>
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
VMHC	Ventrikel-spezifische schwere Myosinkette (engl.: <i>ventricular myosin heavy chain</i>)
w/v	Gewicht pro Volumen (Gewichtsprozent)
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVEs	Verprolin-homologe Proteine der WASP-Familie
WB	Western Blot
WISH	<i>Whole Mount in situ</i> -Hybridisierung
wnt	setzt sich aus Wingless und Int-1 zusammen
WT	Wildtyp
YSL	synzytiale Dotterzellschicht (engl.: <i>yolk syncytial layer</i>)
Zb	Zebrabärbling

LITERATUR

Aamar, E. and Dawid, I. B. (2010) 'Sox17 and chordin are required for formation of Kupffer's vesicle and left-right asymmetry determination in zebrafish', *Dev Dyn* 239(11): 2980-8.

Abe, H., Obinata, T., Minamide, L. S. and Bamburg, J. R. (1996) 'Xenopus laevis actin-depolymerizing factor/cofilin: a phosphorylation-regulated protein essential for development', *J Cell Biol* 132(5): 871-85.

Abe, H., Ohshima, S. and Obinata, T. (1989) 'A cofilin-like protein is involved in the regulation of actin assembly in developing skeletal muscle', *J Biochem* 106(4): 696-702.

Ablooglu, A. J., Tkachenko, E., Kang, J. and Shattil, S. J. (2010) 'Integrin α V is necessary for gastrulation movements that regulate vertebrate body asymmetry', *Development* 137(20): 3449-58.

Agrawal, P. B., Greenleaf, R. S., Tomczak, K. K., Lehtokari, V. L., Wallgren-Pettersson, C., Wallefeld, W., Laing, N. G., Darras, B. T., Maciver, S. K., Dormitzer, P. R. et al. (2007) 'Nemaline myopathy with minicores caused by mutation of the CFL2 gene encoding the skeletal muscle actin-binding protein, cofilin-2', *Am J Hum Genet* 80(1): 162-7.

Agrawal, P. B., Joshi, M., Savic, T., Chen, Z. and Beggs, A. H. (2012) 'Normal myofibrillar development followed by progressive sarcomeric disruption with actin accumulations in a mouse Cfl2 knockout demonstrates requirement of cofilin-2 for muscle maintenance', *Hum Mol Genet* 21(10): 2341-56.

Alexander, J. and Stainier, D. Y. (1999) 'A molecular pathway leading to endoderm formation in zebrafish', *Curr Biol* 9(20): 1147-57.

Amack, J. D., Wang, X. and Yost, H. J. (2007) 'Two T-box genes play independent and cooperative roles to regulate morphogenesis of ciliated Kupffer's vesicle in zebrafish', *Dev Biol* 310(2): 196-210.

Amack, J. D. and Yost, H. J. (2004) 'The T box transcription factor no tail in ciliated cells controls zebrafish left-right asymmetry', *Curr Biol* 14(8): 685-90.

Andrianantoandro, E. and Pollard, T. D. (2006) 'Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin', *Mol Cell* 24(1): 13-23.

Aw, S. and Levin, M. (2009) 'Is left-right asymmetry a form of planar cell polarity?', *Development* 136(3): 355-66.

Baker, K., Holtzman, N. G. and Burdine, R. D. (2008) 'Direct and indirect roles for Nodal signaling in two axis conversions during asymmetric morphogenesis of the zebrafish heart', *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(37): 13924-9.

- Bakkers, J. (2011) 'Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease', *Cardiovasc Res* 91(2): 279-88.
- Balza, R. O., Jr. and Misra, R. P. (2006) 'Role of the serum response factor in regulating contractile apparatus gene expression and sarcomeric integrity in cardiomyocytes', *J Biol Chem* 281(10): 6498-510.
- Bamburg, J. R. (1999) 'Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics', *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 185-230.
- Bamburg, J. R. and Bray, D. (1987) 'Distribution and cellular localization of actin depolymerizing factor', *J Cell Biol* 105(6 Pt 1): 2817-25.
- Bamburg, J. R. and Wiggan, O. P. (2002) 'ADF/cofilin and actin dynamics in disease', *Trends Cell Biol* 12(12): 598-605.
- Bartosch, G. (2006) 'Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species', *Clin Chim Acta* 368(1-2): 53-76.
- Beis, D., Bartman, T., Jin, S. W., Scott, I. C., D'Amico, L. A., Ober, E. A., Verkade, H., Frantsve, J., Field, H. A., Wehman, A. et al. (2005) 'Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development', *Development* 132(18): 4193-204.
- Berdougo, E., Coleman, H., Lee, D. H., Stainier, D. Y. and Yelon, D. (2003) 'Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish', *Development* 130(24): 6121-9.
- Bernstein, B. W. and Bamburg, J. R. (1982) 'Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF)', *Cell Motil* 2(1): 1-8.
- Bernstein, B. W. and Bamburg, J. R. (2010) 'ADF/cofilin: a functional node in cell biology', *Trends Cell Biol* 20(4): 187-95.
- Bisgrove, B. W., Morelli, S. H. and Yost, H. J. (2003) 'Genetics of human laterality disorders: insights from vertebrate model systems', *Annu Rev Genomics Hum Genet* 4: 1-32.
- Black, B. L. and Olson, E. N. (1998) 'Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins', *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 167-96.
- Blair, A., Tomlinson, A., Pham, H., Gunsalus, K. C., Goldberg, M. L. and Laski, F. A. (2006) 'Twinstar, the Drosophila homolog of cofilin/ADF, is required for planar cell polarity patterning', *Development* 133(9): 1789-97.
- Blanchoin, L. and Pollard, T. D. (1999) 'Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments', *J Biol Chem* 274(22): 15538-46.
- Bobkov, A. A., Muhlrads, A., Kokabi, K., Vorobiev, S., Almo, S. C. and Reisler, E. (2002) 'Structural effects of cofilin on longitudinal contacts in F-actin', *J Mol Biol* 323(4): 739-50.

Borovina, A., Superina, S., Voskas, D. and Ciruna, B. (2010) 'Vangl2 directs the posterior tilting and asymmetric localization of motile primary cilia', *Nat Cell Biol* 12(4): 407-12.

Bowen, M. A. and Aruffo, A. (1999) 'Adhesion molecules, their receptors, and their regulation: analysis of CD6-activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166) interactions', *Transplant Proc* 31(1-2): 795-6.

Bowen, M. A., Patel, D. D., Li, X., Modrell, B., Malacko, A. R., Wang, W. C., Marquardt, H., Neubauer, M., Pesando, J. M., Francke, U. et al. (1995) 'Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand', *J Exp Med* 181(6): 2213-20.

Bowers, P. N., Brueckner, M. and Yost, H. J. (1996) 'The genetics of left-right development and heterotaxia', *Semin Perinatol* 20(6): 577-88.

Brade, T., Gessert, S., Kuhl, M. and Pandur, P. (2007) 'The amphibian second heart field: *Xenopus islet-1* is required for cardiovascular development', *Dev Biol* 311(2): 297-310.

Brueckner, M. (2007) 'Heterotaxia, congenital heart disease, and primary ciliary dyskinesia', *Circulation* 115(22): 2793-5.

Buckingham, M., Meilhac, S. and Zaffran, S. (2005) 'Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells', *Nat Rev Genet* 6(11): 826-35.

Burdine, R. D. and Schier, A. F. (2000) 'Conserved and divergent mechanisms in left-right axis formation', *Genes Dev* 14(7): 763-76.

Burns, F. R., von Kannen, S., Guy, L., Raper, J. A., Kamholz, J. and Chang, S. (1991) 'DM-GRASP, a novel immunoglobulin superfamily axonal surface protein that supports neurite extension', *Neuron* 7(2): 209-20.

Cai, C. L., Liang, X., Shi, Y., Chu, P. H., Pfaff, S. L., Chen, J. and Evans, S. (2003) 'Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart', *Dev Cell* 5(6): 877-89.

Capdevila, J., Vogan, K. J., Tabin, C. J. and Izpisua Belmonte, J. C. (2000) 'Mechanisms of left-right determination in vertebrates', *Cell* 101(1): 9-21.

Carlier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H. and Pantaloni, D. (1997) 'Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility', *J Cell Biol* 136(6): 1307-22.

Cartwright, J. H., Piro, O. and Tuval, I. (2004) 'Fluid-dynamical basis of the embryonic development of left-right asymmetry in vertebrates', *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19): 7234-9.

Chen, J. N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C. P. et al. (1996) 'Mutations affecting

the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish', *Development* 123: 293-302.

Chiang, Y., Chou, C. Y., Hsu, K. F., Huang, Y. F. and Shen, M. R. (2008) 'EGF upregulates Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 by post-translational regulation that is important for cervical cancer cell invasiveness', *J Cell Physiol* 214(3): 810-9.

Chung, W. S. and Stainier, D. Y. (2008) 'Intra-endodermal interactions are required for pancreatic beta cell induction', *Dev Cell* 14(4): 582-93.

Cooper, M. S. and D'Amico, L. A. (1996) 'A cluster of noninvoluting endocytic cells at the margin of the zebrafish blastoderm marks the site of embryonic shield formation', *Dev Biol* 180(1): 184-98.

Cortes, F., Deschaseaux, F., Uchida, N., Labastie, M. C., Frieria, A. M., He, D., Charbord, P. and Peault, B. (1999) 'HCA, an immunoglobulin-like adhesion molecule present on the earliest human hematopoietic precursor cells, is also expressed by stromal cells in blood-forming tissues', *Blood* 93(3): 826-37.

D'Amico, L., Scott, I. C., Jungblut, B. and Stainier, D. Y. (2007) 'A mutation in zebrafish *hmgcr1b* reveals a role for isoprenoids in vertebrate heart-tube formation', *Curr Biol* 17(3): 252-9.

de Campos-Baptista, M. I., Holtzman, N. G., Yelon, D. and Schier, A. F. (2008) 'Nodal signaling promotes the speed and directional movement of cardiomyocytes in zebrafish', *Dev Dyn* 237(12): 3624-33.

de Pater, E., Clijsters, L., Marques, S. R., Lin, Y. F., Garavito-Aguilar, Z. V., Yelon, D. and Bakkers, J. (2009) 'Distinct phases of cardiomyocyte differentiation regulate growth of the zebrafish heart', *Development* 136(10): 1633-41.

DeBernardo, A. P. and Chang, S. (1995) 'Native and recombinant DM-GRASP selectively support neurite extension from neurons that express GRASP', *Dev Biol* 169(1): 65-75.

DeBernardo, A. P. and Chang, S. (1996) 'Heterophilic interactions of DM-GRASP: GRASP-NgCAM interactions involved in neurite extension', *J Cell Biol* 133(3): 657-66.

Dedova, I. V., Nikolaeva, O. P., Mikhailova, V. V., dos Remedios, C. G. and Levitsky, D. I. (2004) 'Two opposite effects of cofilin on the thermal unfolding of F-actin: a differential scanning calorimetric study', *Biophys Chem* 110(1-2): 119-28.

Degen, W. G., van Kempen, L. C., Gijzen, E. G., van Groningen, J. J., van Kooyk, Y., Bloemers, H. P. and Swart, G. W. (1998) 'MEMD, a new cell adhesion molecule in metastasizing human melanoma cell lines, is identical to ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule)', *Am J Pathol* 152(3): 805-13.

- DesMarais, V., Ichetovkin, I., Condeelis, J. and Hitchcock-DeGregori, S. E. (2002) 'Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge', *J Cell Sci* 115(Pt 23): 4649-60.
- Diekmann, H. and Stuermer, C. A. (2009) 'Zebrafish neurolin-a and -b, orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding', *J Comp Neurol* 513(1): 38-50.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z. et al. (1996) 'A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish', *Development* 123: 37-46.
- Eisen, J. S. and Smith, J. C. (2008) 'Controlling morpholino experiments: don't stop making antisense', *Development* 135(10): 1735-43.
- Ekker, S. C. (2000) 'Morphants: a new systematic vertebrate functional genomics approach', *Yeast* 17(4): 302-306.
- Essner, J. J., Amack, J. D., Nyholm, M. K., Harris, E. B. and Yost, H. J. (2005) 'Kupffer's vesicle is a ciliated organ of asymmetry in the zebrafish embryo that initiates left-right development of the brain, heart and gut', *Development* 132(6): 1247-60.
- Essner, J. J., Vogan, K. J., Wagner, M. K., Tabin, C. J., Yost, H. J. and Brueckner, M. (2002) 'Conserved function for embryonic nodal cilia', *Nature* 418(6893): 37-8.
- Francescatto, L., Rothschild, S. C., Myers, A. L. and Tombes, R. M. (2010) 'The activation of membrane targeted CaMK-II in the zebrafish Kupffer's vesicle is required for left-right asymmetry', *Development* 137(16): 2753-62.
- Gao, W., Xu, L., Guan, R., Liu, X., Han, Y., Wu, Q., Xiao, Y., Qi, F., Zhu, Z., Lin, S. et al. (2011) 'Wdr18 is required for Kupffer's vesicle formation and regulation of body asymmetry in zebrafish', *PLoS One* 6(8): e23386.
- Gessert, S., Maurus, D., Brade, T., Walther, P., Pandur, P. and Kuhl, M. (2008) 'DM-GRASP/ALCAM/CD166 is required for cardiac morphogenesis and maintenance of cardiac identity in first heart field derived cells', *Dev Biol* 321(1): 150-61.
- Grimes, A. C., Stadt, H. A., Shepherd, I. T. and Kirby, M. L. (2006) 'Solving an enigma: arterial pole development in the zebrafish heart', *Dev Biol* 290(2): 265-76.
- Guner-Ataman, B., Paffett-Lugassy, N., Adams, M. S., Nevis, K. R., Jahangiri, L., Obregon, P., Kikuchi, K., Poss, K. D., Burns, C. E. and Burns, C. G. (2013) 'Zebrafish second heart field development relies on progenitor specification in anterior lateral plate mesoderm and nkx2.5 function', *Development* 140(6): 1353-63.
- Gurniak, C. B., Perlas, E. and Witke, W. (2005) 'The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration', *Dev Biol* 278(1): 231-41.

Hami, D., Grimes, A. C., Tsai, H. J. and Kirby, M. L. (2011) 'Zebrafish cardiac development requires a conserved secondary heart field', *Development* 138(11): 2389-98.

Hashimoto, H., Rebagliati, M., Ahmad, N., Muraoka, O., Kurokawa, T., Hibi, M. and Suzuki, T. (2004) 'The Cerberus/Dan-family protein Charon is a negative regulator of Nodal signaling during left-right patterning in zebrafish', *Development* 131(8): 1741-53.

Haugland, R. P. (2005) 'The handbook: A guide to fluorescent probes and labeling technologies', Tenth Edition, Molecular Probes, Eugene, OR.

Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y. and Eguchi, G. (1997) 'High-frequency generation of transgenic zebrafish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebrafish origin', *Dev Biol* 192(2): 289-99.

Hinitz, Y., Pan, L., Walker, C., Dowd, J., Moens, C. B. and Hughes, S. M. (2012) 'Zebrafish Mef2ca and Mef2cb are essential for both first and second heart field cardiomyocyte differentiation', *Dev Biol* 369(2): 199-210.

Hirata, H., Murakami, Y., Miyamoto, Y., Tosaka, M., Inoue, K., Nagahashi, A., Jakt, L. M., Asahara, T., Iwata, H., Sawa, Y. et al. (2006) 'ALCAM (CD166) is a surface marker for early murine cardiomyocytes', *Cells Tissues Organs* 184(3-4): 172-80.

Hirokawa, N., Tanaka, Y., Okada, Y. and Takeda, S. (2006) 'Nodal flow and the generation of left-right asymmetry', *Cell* 125(1): 33-45.

Huang, T. Y., DerMardirossian, C. and Bokoch, G. M. (2006) 'Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics', *Curr Opin Cell Biol* 18(1): 26-31.

Hutson, M. R., Zeng, X. L., Kim, A. J., Antoon, E., Harward, S. and Kirby, M. L. (2010) 'Arterial pole progenitors interpret opposing FGF/BMP signals to proliferate or differentiate', *Development* 137(18): 3001-11.

Iida, K. and Yahara, I. (1999) 'Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in *Saccharomyces cerevisiae*', *Genes Cells* 4(1): 21-32.

Ikeda, S., Cunningham, L. A., Boggess, D., Hawes, N., Hobson, C. D., Sundberg, J. P., Naggert, J. K., Smith, R. S. and Nishina, P. M. (2003) 'Aberrant actin cytoskeleton leads to accelerated proliferation of corneal epithelial cells in mice deficient for destrin (actin depolymerizing factor)', *Hum Mol Genet* 12(9): 1029-37.

Ilagan, R., Abu-Issa, R., Brown, D., Yang, Y. P., Jiao, K., Schwartz, R. J., Klingensmith, J. and Meyers, E. N. (2006) 'Fgf8 is required for anterior heart field development', *Development* 133(12): 2435-45.

Inoue, A., Takahashi, M., Hatta, K., Hotta, Y. and Okamoto, H. (1994) 'Developmental regulation of islet-1 mRNA expression during neuronal differentiation in embryonic zebrafish', *Dev Dyn* 199(1): 1-11.

Jessen, J. R. (2012) 'Analyzing planar cell polarity during zebrafish gastrulation', *Methods Mol Biol* 839: 69-78.

Jin, S. W., Beis, D., Mitchell, T., Chen, J. N. and Stainier, D. Y. (2005) 'Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish', *Development* 132(23): 5199-209.

Jurynek, M. J., Xia, R., Mackrill, J. J., Gunther, D., Crawford, T., Flanigan, K. M., Abramson, J. J., Howard, M. T. and Grunwald, D. J. (2008) 'Selenoprotein N is required for ryanodine receptor calcium release channel activity in human and zebrafish muscle', *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(34): 12485-90.

Kanki, J. P., Chang, S. and Kuwada, J. Y. (1994) 'The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse', *J Neurobiol* 25(7): 831-45.

Kaplan, J. H. (2005) 'A moving new role for the sodium pump in epithelial cells and carcinomas', *Sci STKE* 2005(289): pe31.

Keegan, B. R., Meyer, D. and Yelon, D. (2004) 'Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula', *Development* 131(13): 3081-91.

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F. (1995) 'Stages of embryonic development of the zebrafish', *Dev Dyn* 203(3): 253-310.

Konzer, A. (2012) 'Die Etablierung massenspektrometrischer quantitativer Studien des Herzproteoms während der embryonalen Entwicklung und der Alterung', Justus-Liebig-Universität, Gießen.

Konzer, A., Ruhs, A., Braun, H., Jungblut, B., Braun, T. and Krueger, M. (2013) 'Stable isotope labelling in zebrafish allows in vivo monitoring of cardiac morphogenesis', *Mol Cell Proteomics*.

Korzh, V., Edlund, T. and Thor, S. (1993) 'Zebrafish primary neurons initiate expression of the LIM homeodomain protein Isl-1 at the end of gastrulation', *Development* 118(2): 417-25.

Kosaki, K. and Casey, B. (1998) 'Genetics of human left-right axis malformations', *Semin Cell Dev Biol* 9(1): 89-99.

Kramer-Zucker, A. G., Olale, F., Haycraft, C. J., Yoder, B. K., Schier, A. F. and Drummond, I. A. (2005) 'Cilia-driven fluid flow in the zebrafish pronephros, brain and Kupffer's vesicle is required for normal organogenesis', *Development* 132(8): 1907-21.

Kuhn, T. B. and Bamburg, J. R. (2008) 'Tropomyosin and ADF/cofilin as collaborators and competitors', *Adv Exp Med Biol* 644: 232-49.

Laessing, U., Giordano, S., Stecher, B., Lottspeich, F. and Stuermer, C. A. (1994) 'Molecular characterization of fish neurolin: a growth-associated cell surface protein and member of the

immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN', *Differentiation* 56(1-2): 21-9.

Landerholm, T. E., Dong, X. R., Lu, J., Belaguli, N. S., Schwartz, R. J. and Majesky, M. W. (1999) 'A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells', *Development* 126(10): 2053-62.

Lazic, S. and Scott, I. C. (2011) 'Mef2cb regulates late myocardial cell addition from a second heart field-like population of progenitors in zebrafish', *Dev Biol* 354(1): 123-33.

Lee, J. D. and Anderson, K. V. (2008) 'Morphogenesis of the node and notochord: the cellular basis for the establishment and maintenance of left-right asymmetry in the mouse', *Dev Dyn* 237(12): 3464-76.

Lee, K., Jung, J., Kim, M. and Guidotti, G. (2001) 'Interaction of the alpha subunit of Na,K-ATPase with cofilin', *Biochem J* 353(Pt 2): 377-85.

Lenhart, K. F., Lin, S. Y., Titus, T. A., Postlethwait, J. H. and Burdine, R. D. (2011) 'Two additional midline barriers function with midline lefty1 expression to maintain asymmetric Nodal signaling during left-right axis specification in zebrafish', *Development* 138(20): 4405-10.

Lepilina, A., Coon, A. N., Kikuchi, K., Holdway, J. E., Roberts, R. W., Burns, C. G. and Poss, K. D. (2006) 'A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration', *Cell* 127(3): 607-19.

Levin, M. (2005) 'Left-right asymmetry in embryonic development: a comprehensive review', *Mech Dev* 122(1): 3-25.

Lin, C. W., Yen, S. T., Chang, H. T., Chen, S. J., Lai, S. L., Liu, Y. C., Chan, T. H., Liao, W. L. and Lee, S. J. (2010) 'Loss of cofilin 1 disturbs actin dynamics, adhesion between enveloping and deep cell layers and cell movements during gastrulation in zebrafish', *PLoS One* 5(12): e15331.

Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C. and Olson, E. N. (1997) 'Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C', *Science* 276(5317): 1404-7.

Lohr, J. L. and Yost, H. J. (2000) 'Vertebrate model systems in the study of early heart development: *Xenopus* and zebrafish', *Am J Med Genet* 97(4): 248-57.

Long, S., Ahmad, N. and Rebagliati, M. (2003) 'The zebrafish nodal-related gene southpaw is required for visceral and diencephalic left-right asymmetry', *Development* 130(11): 2303-16.

Lopes, S. S., Lourenco, R., Pacheco, L., Moreno, N., Kreiling, J. and Saude, L. (2010) 'Notch signalling regulates left-right asymmetry through ciliary length control', *Development* 137(21): 3625-32.

Lowe, L. A., Yamada, S. and Kuehn, M. R. (2001) 'Genetic dissection of nodal function in patterning the mouse embryo', *Development* 128(10): 1831-43.

Lub, M., van Kooyk, Y., van Vliet, S. J. and Figdor, C. G. (1997) 'Dual role of the actin cytoskeleton in regulating cell adhesion mediated by the integrin lymphocyte function-associated molecule-1', *Mol Biol Cell* 8(2): 341-51.

Mably, J. D., Mohideen, M. A., Burns, C. G., Chen, J. N. and Fishman, M. C. (2003) 'Heart of glass regulates the concentric growth of the heart in zebrafish', *Curr Biol* 13(24): 2138-47.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K. and Narumiya, S. (1999) 'Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase', *Science* 285(5429): 895-8.

Mahaffey, J. P., Grego-Bessa, J., Liem, K. F., Jr. and Anderson, K. V. (2013) 'Cofilin and Vangl2 cooperate in the initiation of planar cell polarity in the mouse embryo', *Development* 140(6): 1262-71.

Mann, C. J., Hinits, Y. and Hughes, S. M. (2006) 'Comparison of neurolin (ALCAM) and neurolin-like cell adhesion molecule (NLCAM) expression in zebrafish', *Gene Expr Patterns* 6(8): 952-63.

Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D. and Solnica-Krezel, L. (2002) 'Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements', *Curr Biol* 12(11): 876-84.

Marszalek, J. R., Ruiz-Lozano, P., Roberts, E., Chien, K. R. and Goldstein, L. S. (1999) 'Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II', *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 5043-8.

Matsui, T. and Bessho, Y. (2012) 'Left-right asymmetry in zebrafish', *Cell Mol Life Sci* 69(18): 3069-77.

Matsui, T., Thitamadee, S., Murata, T., Kakinuma, H., Nabetani, T., Hirabayashi, Y., Hirate, Y., Okamoto, H. and Bessho, Y. (2011) 'Canopy1, a positive feedback regulator of FGF signaling, controls progenitor cell clustering during Kupffer's vesicle organogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(24): 9881-6.

May-Simera, H. L., Kai, M., Hernandez, V., Osborn, D. P., Tada, M. and Beales, P. L. (2010) 'Bbs8, together with the planar cell polarity protein Vangl2, is required to establish left-right asymmetry in zebrafish', *Dev Biol* 345(2): 215-25.

McGrath, J., Somlo, S., Makova, S., Tian, X. and Brueckner, M. (2003) 'Two populations of node monocilia initiate left-right asymmetry in the mouse', *Cell* 114(1): 61-73.

Melby, A. E., Warga, R. M. and Kimmel, C. B. (1996) 'Specification of cell fates at the dorsal margin of the zebrafish gastrula', *Development* 122(7): 2225-37.

Meno, C., Ito, Y., Saijoh, Y., Matsuda, Y., Tashiro, K., Kuhara, S. and Hamada, H. (1997) 'Two closely-related left-right asymmetrically expressed genes, lefty-1 and lefty-2: their distinct expression domains, chromosomal linkage and direct neuralizing activity in *Xenopus* embryos', *Genes Cells* 2(8): 513-24.

Meno, C., Shimonono, A., Saijoh, Y., Yashiro, K., Mochida, K., Ohishi, S., Noji, S., Kondoh, H. and Hamada, H. (1998) 'lefty-1 is required for left-right determination as a regulator of lefty-2 and nodal', *Cell* 94(3): 287-97.

Miano, J. M., Long, X. and Fujiwara, K. (2007) 'Serum response factor: master regulator of the actin cytoskeleton and contractile apparatus', *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C70-81.

Miralles, F. and Visa, N. (2006) 'Actin in transcription and transcription regulation', *Curr Opin Cell Biol* 18(3): 261-6.

Miyauchi-Nomura, S., Obinata, T. and Sato, N. (2012) 'Cofilin is required for organization of sarcomeric actin filaments in chicken skeletal muscle cells', *Cytoskeleton (Hoboken)* 69(5): 290-302.

Mohri, K., Takano-Ohmuro, H., Nakashima, H., Hayakawa, K., Endo, T., Hanaoka, K. and Obinata, T. (2000) 'Expression of cofilin isoforms during development of mouse striated muscles', *J Muscle Res Cell Motil* 21(1): 49-57.

Moon, A. and Drubin, D. G. (1995) 'The ADF/cofilin proteins: stimulus-responsive modulators of actin dynamics', *Mol Biol Cell* 6(11): 1423-31.

Moretti, A., Caron, L., Nakano, A., Lam, J. T., Bernshausen, A., Chen, Y., Qyang, Y., Bu, L., Sasaki, M., Martin-Puig, S. et al. (2006) 'Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification', *Cell* 127(6): 1151-65.

Moriyama, K., Nishida, E., Yonezawa, N., Sakai, H., Matsumoto, S., Iida, K. and Yahara, I. (1990) 'Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin. Cloning and expression of porcine brain destrin cDNA', *J Biol Chem* 265(10): 5768-73.

Mouneimne, G., Soon, L., DesMarais, V., Sidani, M., Song, X., Yip, S. C., Ghosh, M., Eddy, R., Backer, J. M. and Condeelis, J. (2004) 'Phospholipase C and cofilin are required for carcinoma cell directionality in response to EGF stimulation', *J Cell Biol* 166(5): 697-708.

Nakamura, T. and Hamada, H. (2012) 'Left-right patterning: conserved and divergent mechanisms', *Development* 139(18): 3257-62.

Nakamura, T., Mine, N., Nakaguchi, E., Mochizuki, A., Yamamoto, M., Yashiro, K., Meno, C. and Hamada, H. (2006) 'Generation of robust left-right asymmetry in the mouse embryo requires a self-enhancement and lateral-inhibition system', *Dev Cell* 11(4): 495-504.

Nakashima, K., Sato, N., Nakagaki, T., Abe, H., Ono, S. and Obinata, T. (2005) 'Two mouse cofilin isoforms, muscle-type (MCF) and non-muscle type (NMCF), interact with F-actin with different efficiencies', *J Biochem* 138(4): 519-26.

Neidhardt, L., Gasca, S., Wertz, K., Obermayr, F., Worpenberg, S., Lehrach, H. and Herrmann, B. G. (2000) 'Large-scale screen for genes controlling mammalian embryogenesis, using high-throughput gene expression analysis in mouse embryos', *Mech Dev* 98(1-2): 77-94.

Nelissen, J. M., Peters, I. M., de Grooth, B. G., van Kooyk, Y. and Figdor, C. G. (2000) 'Dynamic regulation of activated leukocyte cell adhesion molecule-mediated homotypic cell adhesion through the actin cytoskeleton', *Mol Biol Cell* 11(6): 2057-68.

Neugebauer, J. M., Amack, J. D., Peterson, A. G., Bisgrove, B. W. and Yost, H. J. (2009) 'FGF signalling during embryo development regulates cilia length in diverse epithelia', *Nature* 458(7238): 651-4.

Nishida, E., Maekawa, S. and Sakai, H. (1984) 'Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin', *Biochemistry* 23(22): 5307-13.

Nonaka, S., Tanaka, Y., Okada, Y., Takeda, S., Harada, A., Kanai, Y., Kido, M. and Hirokawa, N. (1998) 'Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein', *Cell* 95(6): 829-37.

Nonaka, S., Yoshida, S., Watanabe, D., Ikeuchi, S., Goto, T., Marshall, W. F. and Hamada, H. (2005) 'De novo formation of left-right asymmetry by posterior tilt of nodal cilia', *PLoS Biol* 3(8): e268.

Nugent, E. W., Plauth, W.H., Edwards, J. E. and Williams, W. H. (1994) 'The pathology, pathophysiology, recognition and treatment of congenital heart disease', Ninth Edition, ed. Schlant, R. C. and R.W. Alexander, R. W., pp. 1761–1828. McGraw-Hill, New York.

Oishi, I., Kawakami, Y., Raya, A., Callol-Massot, C. and Izpisua Belmonte, J. C. (2006) 'Regulation of primary cilia formation and left-right patterning in zebrafish by a noncanonical Wnt signaling mediator, *duboraya*', *Nat Genet* 38(11): 1316-22.

Okada, Y., Takeda, S., Tanaka, Y., Izpisua Belmonte, J. C. and Hirokawa, N. (2005) 'Mechanism of nodal flow: a conserved symmetry breaking event in left-right axis determination', *Cell* 121(4): 633-44.

Olson, E. N. and Nordheim, A. (2010) 'Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions', *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(5): 353-65.

Ono, S. (2007) 'Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics', *Int Rev Cytol* 258: 1-82.

Ono, S., Abe, H. and Obinata, T. (1996) 'Stimulus-dependent disorganization of actin filaments induced by overexpression of cofilin in C2 myoblasts', *Cell Struct Funct* 21(6): 491-9.

- Ono, S., Baillie, D. L. and Benian, G. M. (1999) 'UNC-60B, an ADF/cofilin family protein, is required for proper assembly of actin into myofibrils in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle', *J Cell Biol* 145(3): 491-502.
- Ono, S., Minami, N., Abe, H. and Obinata, T. (1994) 'Characterization of a novel cofilin isoform that is predominantly expressed in mammalian skeletal muscle', *J Biol Chem* 269(21): 15280-6.
- Oteiza, P., Koppen, M., Concha, M. L. and Heisenberg, C. P. (2008) 'Origin and shaping of the laterality organ in zebrafish', *Development* 135(16): 2807-13.
- Oteiza, P., Koppen, M., Krieg, M., Pulgar, E., Farias, C., Melo, C., Preibisch, S., Muller, D., Tada, M., Hartel, S. et al. (2010) 'Planar cell polarity signalling regulates cell adhesion properties in progenitors of the zebrafish laterality organ', *Development* 137(20): 3459-68.
- Park, E. J., Ogden, L. A., Talbot, A., Evans, S., Cai, C. L., Black, B. L., Frank, D. U. and Moon, A. M. (2006) 'Required, tissue-specific roles for Fgf8 in outflow tract formation and remodeling', *Development* 133(12): 2419-33.
- Park, M. and Moon, R. T. (2002) 'The planar cell-polarity gene *stbm* regulates cell behaviour and cell fate in vertebrate embryos', *Nat Cell Biol* 4(1): 20-5.
- Pavlov, D., Muhlrads, A., Cooper, J., Wear, M. and Reisler, E. (2007) 'Actin filament severing by cofilin', *J Mol Biol* 365(5): 1350-8.
- Peduzzi, J. D., Irwin, M. H. and Geisert, E. E., Jr. (1994) 'Distribution and characteristics of a 90 kDa protein, KG-CAM, in the rat CNS', *Brain Res* 640(1-2): 296-307.
- Pennekamp, P., Karcher, C., Fischer, A., Schweickert, A., Skryabin, B., Horst, J., Blum, M. and Dworniczak, B. (2002) 'The ion channel polycystin-2 is required for left-right axis determination in mice', *Curr Biol* 12(11): 938-43.
- Pourquie, O., Corbel, C., Le Caer, J. P., Rossier, J. and Le Douarin, N. M. (1992) 'BEN, a surface glycoprotein of the immunoglobulin superfamily, is expressed in a variety of developing systems', *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5261-5.
- Prall, O. W., Menon, M. K., Solloway, M. J., Watanabe, Y., Zaffran, S., Bajolle, F., Biben, C., McBride, J. J., Robertson, B. R., Chaulet, H. et al. (2007) 'An Nkx2-5/Bmp2/Smad1 negative feedback loop controls heart progenitor specification and proliferation', *Cell* 128(5): 947-59.
- Ramsdell, A. F. (2005) 'Left-right asymmetry and congenital cardiac defects: getting to the heart of the matter in vertebrate left-right axis determination', *Dev Biol* 288(1): 1-20.
- Raya, A. and Izpisua Belmonte, J. C. (2006) 'Left-right asymmetry in the vertebrate embryo: from early information to higher-level integration', *Nat Rev Genet* 7(4): 283-93.
- Rodal, A. A., Tetreault, J. W., Lappalainen, P., Drubin, D. G. and Amberg, D. C. (1999) 'Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments', *J Cell Biol* 145(6): 1251-64.

Rohr, S., Otten, C. and Abdelilah-Seyfried, S. (2008) 'Asymmetric involution of the myocardial field drives heart tube formation in zebrafish', *Circ Res* 102(2): e12-9.

Ryan, A. K., Blumberg, B., Rodriguez-Esteban, C., Yonei-Tamura, S., Tamura, K., Tsukui, T., de la Pena, J., Sabbagh, W., Greenwald, J., Choe, S. et al. (1998) 'Pitx2 determines left-right asymmetry of internal organs in vertebrates', *Nature* 394(6693): 545-51.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) 'Molecular cloning: A laboratory manual', Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sarmah, B., Latimer, A. J., Appel, B. and Wente, S. R. (2005) 'Inositol polyphosphates regulate zebrafish left-right asymmetry', *Dev Cell* 9(1): 133-45.

Schier, A. F. (2003) 'Nodal signaling in vertebrate development', *Annu Rev Cell Dev Biol* 19: 589-621.

Schier, A. F. (2009) 'Nodal morphogens', *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(5): a003459.

Schlueter, J. and Brand, T. (2007) 'Left-right axis development: examples of similar and divergent strategies to generate asymmetric morphogenesis in chick and mouse embryos', *Cytogenet Genome Res* 117(1-4): 256-67.

Schoenebeck, J. J. and Yelon, D. (2007) 'Illuminating cardiac development: Advances in imaging add new dimensions to the utility of zebrafish genetics', *Semin Cell Dev Biol* 18(1): 27-35.

Scott, R. W. and Olson, M. F. (2007) 'LIM kinases: function, regulation and association with human disease', *J Mol Med (Berl)* 85(6): 555-68.

Sekine-Aizawa, Y., Omori, A. and Fujita, S. C. (1998) 'MuSC, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is expressed in neurons of a subset of cranial sensory ganglia in the mouse embryo', *Eur J Neurosci* 10(9): 2810-24.

Settleman, J. (2003) 'A nuclear MAL-function links Rho to SRF', *Mol Cell* 11(5): 1121-3.

Shiratori, H. and Hamada, H. (2006) 'The left-right axis in the mouse: from origin to morphology', *Development* 133(11): 2095-104.

Simons, M. and Mlodzik, M. (2008) 'Planar cell polarity signaling: from fly development to human disease', *Annu Rev Genet* 42: 517-40.

Skwarek-Maruszewska, A., Hotulainen, P., Mattila, P. K. and Lappalainen, P. (2009) 'Contractility-dependent actin dynamics in cardiomyocyte sarcomeres', *J Cell Sci* 122(Pt 12): 2119-26.

Smith, K. A., Chocron, S., von der Hardt, S., de Pater, E., Soufan, A., Bussmann, J., Schulte-Merker, S., Hammerschmidt, M. and Bakkers, J. (2008) 'Rotation and asymmetric

development of the zebrafish heart requires directed migration of cardiac progenitor cells', *Dev Cell* 14(2): 287-97.

Smith, K. A., Noel, E., Thurlings, I., Rehmann, H., Chocron, S. and Bakkers, J. (2011) 'Bmp and nodal independently regulate *lefty1* expression to maintain unilateral nodal activity during left-right axis specification in zebrafish', *PLoS Genet* 7(9): e1002289.

Solnica-Krezel, L. and Driever, W. (1994) 'Microtubule arrays of the zebrafish yolk cell: organization and function during epiboly', *Development* 120(9): 2443-55.

Stainier, D. Y. (2001) 'Zebrafish genetics and vertebrate heart formation', *Nat Rev Genet* 2(1): 39-48.

Stainier, D. Y., Lee, R. K. and Fishman, M. C. (1993) 'Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation', *Development* 119(1): 31-40.

Stanley, E. G., Biben, C., Elefanty, A., Barnett, L., Koentgen, F., Robb, L. and Harvey, R. P. (2002) 'Efficient Cre-mediated deletion in cardiac progenitor cells conferred by a 3'UTR-ires-Cre allele of the homeobox gene *Nkx2-5*', *Int J Dev Biol* 46(4): 431-9.

Stubbs, J. L., Oishi, I., Izpisua Belmonte, J. C. and Kintner, C. (2008) 'The forkhead protein *Foxj1* specifies node-like cilia in *Xenopus* and zebrafish embryos', *Nat Genet* 40(12): 1454-60.

Sun, Y., Liang, X., Najafi, N., Cass, M., Lin, L., Cai, C. L., Chen, J. and Evans, S. M. (2007) 'Islet 1 is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells', *Dev Biol* 304(1): 286-96.

Supp, D. M., Witte, D. P., Potter, S. S. and Brueckner, M. (1997) 'Mutation of an axonemal dynein affects left-right asymmetry in *inversus viscerum* mice', *Nature* 389(6654): 963-6.

Sutherland, M. J. and Ware, S. M. (2009) 'Disorders of left-right asymmetry: heterotaxy and situs inversus', *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 151C(4): 307-17.

Tabin, C. J. and Vogan, K. J. (2003) 'A two-cilia model for vertebrate left-right axis specification', *Genes Dev* 17(1): 1-6.

Takeda, S., Yonekawa, Y., Tanaka, Y., Okada, Y., Nonaka, S. and Hirokawa, N. (1999) 'Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by *kif3A*^{-/-} mice analysis', *J Cell Biol* 145(4): 825-36.

Tanaka, H., Matsui, T., Agata, A., Tomura, M., Kubota, I., McFarland, K. C., Kohr, B., Lee, A., Phillips, H. S. and Shelton, D. L. (1991) 'Molecular cloning and expression of a novel adhesion molecule, SC1', *Neuron* 7(4): 535-45.

Tanaka, Y., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005) 'FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination', *Nature* 435(7039): 172-7.

Te Riet, J., Zimmerman, A. W., Cambi, A., Joosten, B., Speller, S., Torensma, R., van Leeuwen, F. N., Figdor, C. G. and de Lange, F. (2007) 'Distinct kinetic and mechanical properties govern ALCAM-mediated interactions as shown by single-molecule force spectroscopy', *J Cell Sci* 120(Pt 22): 3965-76.

Thisse, B., Heyer, V., Lux, A., Alunni, V., Degrave, A., Seiliez, I., Kirchner, J., Parkhill, J. P. and Thisse, C. (2004) 'Spatial and temporal expression of the zebrafish genome by large-scale in situ hybridization screening', *Methods Cell Biol* 77: 505-19.

Thisse, C. and Thisse, B. (1999) 'Antivin, a novel and divergent member of the TGFbeta superfamily, negatively regulates mesoderm induction', *Development* 126(2): 229-40.

Tirosh-Finkel, L., Zeisel, A., Brodt-Ivenshitz, M., Shamaï, A., Yao, Z., Seger, R., Domany, E. and Tzahor, E. (2010) 'BMP-mediated inhibition of FGF signaling promotes cardiomyocyte differentiation of anterior heart field progenitors', *Development* 137(18): 2989-3000.

Toshima, J., Toshima, J. Y., Takeuchi, K., Mori, R. and Mizuno, K. (2001) 'Cofilin phosphorylation and actin reorganization activities of testicular protein kinase 2 and its predominant expression in testicular Sertoli cells', *J Biol Chem* 276(33): 31449-58.

van Kempen, L. C., Nelissen, J. M., Degen, W. G., Torensma, R., Weidle, U. H., Bloemers, H. P., Figdor, C. G. and Swart, G. W. (2001) 'Molecular basis for the homophilic activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)-ALCAM interaction', *J Biol Chem* 276(28): 25783-90.

van Kempen, L. C., van den Oord, J. J., van Muijen, G. N., Weidle, U. H., Bloemers, H. P. and Swart, G. W. (2000) 'Activated leukocyte cell adhesion molecule/CD166, a marker of tumor progression in primary malignant melanoma of the skin', *Am J Pathol* 156(3): 769-74.

Van Troys, M., Huyck, L., Leyman, S., Dhaese, S., Vandekerckhove, J. and Ampe, C. (2008) 'Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation', *Eur J Cell Biol* 87(8-9): 649-67.

Vartiainen, M. K., Mustonen, T., Mattila, P. K., Ojala, P. J., Thesleff, I., Partanen, J. and Lappalainen, P. (2002) 'The three mouse actin-depolymerizing factor/cofilins evolved to fulfill cell-type-specific requirements for actin dynamics', *Mol Biol Cell* 13(1): 183-94.

Verdoni, A. M., Aoyama, N., Ikeda, A. and Ikeda, S. (2008) 'Effect of destrin mutations on the gene expression profile in vivo', *Physiol Genomics* 34(1): 9-21.

Verkhusha, V. V., Akovbian, N. A., Efremenko, E. N., Varfolomeyev, S. D. and Vrzheschch, P. V. (2001) 'Kinetic analysis of maturation and denaturation of DsRed, a coral-derived red fluorescent protein', *Biochemistry (Mosc)* 66(12): 1342-51.

Vincent, S. D. and Buckingham, M. E. (2010) 'How to make a heart: the origin and regulation of cardiac progenitor cells', *Curr Top Dev Biol* 90: 1-41.

Vogel, A. M. and Weinstein, B. M. (2000) 'Studying vascular development in the zebrafish', *Trends Cardiovasc Med* 10(8): 352-60.

Wallingford, J. B. (2012) 'Planar cell polarity and the developmental control of cell behavior in vertebrate embryos', *Annu Rev Cell Dev Biol* 28: 627-53.

Wallingford, J. B., Fraser, S. E. and Harland, R. M. (2002) 'Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development', *Dev Cell* 2(6): 695-706.

Wang, W., Eddy, R. and Condeelis, J. (2007) 'The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis', *Nat Rev Cancer* 7(6): 429-40.

Wang, G., Manning, M. L. and Amack, J. D. (2012) 'Regional cell shape changes control form and function of Kupffer's vesicle in the zebrafish embryo', *Dev Biol* 370(1): 52-62.

Wang, X. and Yost, H. J. (2008) 'Initiation and propagation of posterior to anterior (PA) waves in zebrafish left-right development', *Dev Dyn* 237(12): 3640-7.

Weiner, J. A., Koo, S. J., Nicolas, S., Fraboulet, S., Pfaff, S. L., Pourquie, O. and Sanes, J. R. (2004) 'Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1', *Mol Cell Neurosci* 27(1): 59-69.

Westerfield, M. (2000) 'The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*)', Fourth Edition, University of Oregon Press, Eugene, OR.

Witzel, H. R., Jungblut, B., Choe, C. P., Crump, J. G., Braun, T. and Dobрева, G. (2012) 'The LIM protein Ajuba restricts the second heart field progenitor pool by regulating Isl1 activity', *Dev Cell* 23(1): 58-70.

Yan, X. and Zhu, X. (2013) 'Branched F-actin as a negative regulator of cilia formation', *Exp Cell Res* 319(2): 147-51.

Yauch, R. L., Felsenfeld, D. P., Kraeft, S. K., Chen, L. B., Sheetz, M. P. and Hemler, M. E. (1997) 'Mutational evidence for control of cell adhesion through integrin diffusion/clustering, independent of ligand binding', *J Exp Med* 186(8): 1347-55.

Yelon, D., Horne, S. A. and Stainier, D. Y. (1999) 'Restricted expression of cardiac myosin genes reveals regulated aspects of heart tube assembly in zebrafish', *Dev Biol* 214(1): 23-37.

Yeoh, S., Pope, B., Mannherz, H. G. and Weeds, A. (2002) 'Determining the differences in actin binding by human ADF and cofilin', *J Mol Biol* 315(4): 911-25.

Yoruk, B., Gillers, B. S., Chi, N. C. and Scott, I. C. (2012) 'Ccm3 functions in a manner distinct from Ccm1 and Ccm2 in a zebrafish model of CCM vascular disease', *Dev Biol* 362(2): 121-31.

Zhan, Q., Bamburg, J. R. and Badwey, J. A. (2003) 'Products of phosphoinositide specific phospholipase C can trigger dephosphorylation of cofilin in chemoattractant stimulated neutrophils', *Cell Motil Cytoskeleton* 54(1): 1-15.

Zhang, Y. and Levin, M. (2009) 'Left-right asymmetry in the chick embryo requires core planar cell polarity protein Vangl2', *Genesis* 47(11): 719-28.

Zhang, M., Zhang, J., Lin, S. C. and Meng, A. (2012) 'beta-Catenin 1 and beta-catenin 2 play similar and distinct roles in left-right asymmetric development of zebrafish embryos', *Development* 139(11): 2009-19.

Zhou, L., Martinez, S. J., Haber, M., Jones, E. V., Bouvier, D., Doucet, G., Corera, A. T., Fon, E. A., Zisch, A. H. and Murai, K. K. (2007) 'EphA4 signaling regulates phospholipase Cgamma1 activation, cofilin membrane association, and dendritic spine morphology', *J Neurosci* 27(19): 5127-38.

Zhou, Y., Cashman, T. J., Nevis, K. R., Obregon, P., Carney, S. A., Liu, Y., Gu, A., Mosimann, C., Sondalle, S., Peterson, R. E. et al. (2011) 'Latent TGF-beta binding protein 3 identifies a second heart field in zebrafish', *Nature* 474(7353): 645-8.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Helene Braun
Geburtsdatum	10.03.1983
Geburtsort	Leninskoje (Kasachstan)
Staatsangehörigkeit	deutsch
E-Mail	Helene.Braun@mpi-bn.mpg.de

Akademische Ausbildung

Seit 11.05.2009	Promotion am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim unter der Betreuung von Dr. Benno Jungblut Thema: „Cofilin 2 reguliert die Alcama-vermittelte Herzmorphogenese und Links-Rechts-Asymmetrie im Zebrafisch“
Oktober 2003 - Mai 2009	Studium an der Technischen Universität Darmstadt Studiengang: Biologie (Diplom) Studienschwerpunkte: Zell- und Entwicklungsbiologie, Tierphysiologie und Biochemie
September 2008 - Mai 2009	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin unter der Betreuung von Dr. Georgia Ponopoulou Thema: „Funktionelle Analyse der konservierten nicht-kodierenden Elemente im Zebrafisch“ Abschlussnote: sehr gut

Schulische Ausbildung

1994-2003	Lichtenbergschule (Gymnasium) in Darmstadt Abschluss: Abitur
-----------	---

Auszeichnungen

Mai 2011	Poster Award „Second International Symposium of the Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System“ (ECCPS), Bad Nauheim
----------	---

VERÖFFENTLICHUNGEN

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Dissertation

- Manuskript in Vorbereitung: **Braun, H.**, Jungblut, B., Konzer, A., Krueger, M., Huisken, J., Munson, C., Trinh, L. A. and Stainier, D. Y. R. „Alcama interacts with Cofilin 2 and regulates myocardial cell shape and configuration during heart looping and chamber differentiation”
- Manuskript in Vorbereitung: **Braun, H.** and Jungblut, B. „Cofilin 2 regulates left/right asymmetry in zebrafish“

Über das Dissertationsthema hinausgehende Veröffentlichungen

- Nikolic, I., Stankovic, N. D., Bicker, F., Meister, J., **Braun, H.**, Awwad, K., Baumgart, J., Simon, K., Thal, S. C., Patra, C. Harter, P. N., Plate, K. H., Engel, F. B., Dimmeler, S., Eble, J. A., Mittelbronn, M., Schäfer, M. K., Jungblut, B., Chavakis, E., Fleming, I., Schmidt, M. H. (2013) 'EGFL7 ligates alphavbeta3 integrin to enhance vessel formation', *Blood* 121(15): 3041-50.
- Konzer, A., Ruhs, A., **Braun, H.**, Jungblut, B., Braun, T. and Krueger, M. (2013) 'Stable isotope labelling in zebrafish allows in vivo monitoring of cardiac morphogenesis', *Mol Cell Proteomics*.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit der Dimpolarbeit

- Hufton, A. L., Mathia, S., **Braun, H.**, Georgi, U., Lehrach, H., Vingron, M., Poustka, A. J. and Panopoulou, G. (2009) 'Deeply conserved chordate noncoding sequences preserve genome syntenen but do not drive gene duplicate retention', *Genome Res* 19(11): 2036-51.

TEILNAHME AN WISSENSCHAFTLICHEN TAGUNGEN

- Oktober 2012 *Fourth Annual Retreat of the International Max Planck Research School for Heart and Lung Research (IMPRS-HLR), Kloster Höchst, Odenwald, Deutschland*
„Muscle Cofilin 2 interacts with Alcam and controls heart morphogenesis and left/right asymmetry in zebrafish” (Vortrag)
- September 2011 *Third Annual Retreat of the International Max Planck Research School for Heart and Lung Research (IMPRS-HLR), Hirschegg, Österreich*
„Muscle Cofilin 2 interacts with Alcam and controls heart morphogenesis and left/right asymmetry in zebrafish”
(Posterpräsentation)
- Mai 2011 *Second International Symposium of the Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System (ECCPS), Bad Nauheim, Deutschland*
„Alcam-mediated cell adhesion in the control of zebrafish heart morphogenesis” (Posterpräsentation)
- August 2010 *Eighth Annual Retreat of the International Graduate Program „Molecular Biology and Medicine of the Lung” (MBML), Rauischholzhausen, Deutschland*
„Alcam-mediated cell adhesion in the control of zebrafish heart morphogenesis” (Posterpräsentation)
- Juni 2010 *Ninth International Conference on Zebrafish Development and Genetics, Madison, Wisconsin, USA*

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, deren Unterstützung und Hilfe die Durchführung der vorliegenden Arbeit überhaupt erst ermöglichten.

An erster Stelle richte ich meinen Dank an Prof. Dr. Dr. Thomas Braun für die Möglichkeit meine Arbeit am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim anfertigen zu können sowie für die Begutachtung dieser Dissertation.

Großer Dank gebührt Prof. Dr. Paul G. Layer für die Bereitschaft meine externe Promotionsarbeit zu betreuen, sowie für seine hilfreichen und positiven Rückmeldungen. Bereits seine Vorlesungen und Seminare weckten meine Begeisterung für die Entwicklungsbiologie.

Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für seine motivierenden Worte.

Dr. Benno Jungblut danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Betreuung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Gergana Dobрева möchte ich mich für viele Ideen, wertvolle Anregungen und Tipps während unseren gemeinsamen Meetings bedanken.

Meinen herzlichen Dank möchte ich den Mädels aus dem Labor, Sonja Hundt und Carina Detzer, ausdrücken. Großen Dank schulde ich Sonja dafür, dass sie ihre ohnehin schon knappe Freizeit für das äußerst sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit opferte. Zudem danke ich ihr für ihre fachliche Unterstützung, ihre geduldigen Erklärungen und hilfreichen Diskussionen. Mein besonderer Dank gilt ebenso meiner „Leidensgenossin“ Carina für den gemeinsam zurückgelegten Weg. Danke Dir für hilfreiche Gespräche bei der täglichen Laborarbeit sowie bei den kleinen Alltagssorgen. Danke Mädels für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors, vor allem für den unvergesslichen USA-Trip!

Anne Konzer danke ich für die stets offene Tür bei Fragen rund um die Proteomik. Weiterhin bin ich Monika Müller-Boche für die tatkräftige Unterstützung im Fischraum zu Dank verpflichtet. Ich möchte mich auch bei meinem Nachbarn Dennis Weber für die Korrekturen bedanken.

Danke an Hagen Witzel für seine stete Hilfsbereitschaft und die nützlichen Ratschläge. *Mille Grazie* an Luca Caputo. Er war eine große Hilfe bei vielen Methodenfragen. Weiterhin bin ich Evgeniy Chichelnitskiy für experimentelle Unterstützung dankbar. Nicht unerwähnt dürfen hier auch Chinmoy Patra, Joaquim Vong, Suchit Ahuja und Tanya Novoyatleva bleiben. Ich möchte mich bei Ihnen für neue Impulse und den freundschaftlichen Umgang bedanken. Ich danke auch allen IMPRS-Studenten für den Ideenaustausch und eine lustige Zeit während unseren jährlichen Retreats.

Torsten, ich danke Dir aus tiefstem Herzen für Deine Liebe, grenzenlose Unterstützung und Verständnis für meine oftmals zeitraubende Tätigkeit. Du hast mich motiviert, meine Launen geduldig ertragen und mir in stressigen Zeiten den Rücken freigehalten. Danke für alles!

Ich danke auch meinem Brüderchen für die moralische Unterstützung und die nötige Ablenkung.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, die mich bedingungslos mein Leben lang und mit allen Mitteln unterstützt und gefördert haben. Eure Liebe und Rückhalt sind für mich von unschätzbarem Wert. Diese Arbeit ist Euch gewidmet.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den